

CYSTEINBIOSYNTHESE IN E. COLI: GENETISCHE UND
BIOCHEMISCHE ANALYSE DER SERIN-ACETYLTRANSFERASE
UND KONSTRUKTION EINES CYSTEIN AUSSCHEIDENDEN STAMMES

Dagmar Schmid

München 1987

CYSTEINBIOSYNTHESE IN E. COLI: GENETISCHE UND
BIOCHEMISCHE ANALYSE DER SERIN-ACETYLTRANSFERASE
UND KONSTRUKTION EINES CYSTEIN AUSSCHIEDENDEN STAMMES

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dagmar Schmid

aus

München

Juni 1987

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1987

Stoffwechsel

1.	Atmung
2.	Verdauung
3.	Blutkreislauf
4.	Exkretion
5.	Stoffwechsel
6.	Wasser
7.	Salze
8.	Enzyme
9.	Leber
10.	Blut
11.	Herz
12.	Atmung
13.	Verdauung
14.	Blutkreislauf
15.	Exkretion
16.	Stoffwechsel
17.	Wasser
18.	Salze
19.	Enzyme
20.	Leber
21.	Blut
22.	Herz
23.	Atmung
24.	Verdauung
25.	Blutkreislauf
26.	Exkretion
27.	Stoffwechsel
28.	Wasser
29.	Salze
30.	Enzyme
31.	Leber
32.	Blut
33.	Herz
34.	Atmung
35.	Verdauung
36.	Blutkreislauf
37.	Exkretion
38.	Stoffwechsel
39.	Wasser
40.	Salze
41.	Enzyme
42.	Leber
43.	Blut
44.	Herz
45.	Atmung
46.	Verdauung
47.	Blutkreislauf
48.	Exkretion
49.	Stoffwechsel
50.	Wasser
51.	Salze
52.	Enzyme
53.	Leber
54.	Blut
55.	Herz
56.	Atmung
57.	Verdauung
58.	Blutkreislauf
59.	Exkretion
60.	Stoffwechsel
61.	Wasser
62.	Salze
63.	Enzyme
64.	Leber
65.	Blut
66.	Herz
67.	Atmung
68.	Verdauung
69.	Blutkreislauf
70.	Exkretion
71.	Stoffwechsel
72.	Wasser
73.	Salze
74.	Enzyme
75.	Leber
76.	Blut
77.	Herz
78.	Atmung
79.	Verdauung
80.	Blutkreislauf
81.	Exkretion
82.	Stoffwechsel
83.	Wasser
84.	Salze
85.	Enzyme
86.	Leber
87.	Blut
88.	Herz
89.	Atmung
90.	Verdauung
91.	Blutkreislauf
92.	Exkretion
93.	Stoffwechsel
94.	Wasser
95.	Salze
96.	Enzyme
97.	Leber
98.	Blut
99.	Herz
100.	Atmung

Meinen Eltern in
Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Die Darstellung der Stoffwechselvorgänge erfolgt in 100 - 1000 Zeilen
jede Zeile wird mit einem bestimmten Wort oder Satz als 1. Teil
bezeichnet.

Abkürzungen

A	Adenosin
amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
C	Cytidin
cam	Chloramphenicol
Ci	Curie
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
G	Guanosin
kb	Kilobasen
M	molar
OAS	O-Acetyl-L-Serin
OAS-SH	O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase
³² P	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
pfu	Plaque bildende Einheiten
rpm	Umdrehungen pro Minute
³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop mit der Massenzahl 35
SAT	Serin-Acetyltransferase
SDS	Natriumlaurylsulfat
T	Thymidin
tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

Die Darstellung der DNS-Sequenz erfolgt in 5' - 3' Richtung; jedes Nukleotid wird entsprechend seiner Base mit A,T,G,C bezeichnet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	10
I. Mikrobiologische Methoden	10
1. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	10
2. Medien und Anzuchtbedingungen	13
II. Quantitative Bestimmungsmethoden	14
1. Bestimmung von Cystein	14
2. Bestimmung von Protein	14
III. Proteinchemische und enzymatische Methoden	15
1. Präparation von Rohextrakten für die Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität	15
2. Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
2.1. Serin-Acetyltransferase Test	15
2.2. O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase Test	16
2.3. Aminoacyl-tRNS-Synthetase Test	16
2.4. Cystein-Desulphydrase Test	16
3. Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus E.coli	17
3.1. Präparation von S30 und S100 Rohextrakten	17
3.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	17
3.3. Chromatographie an DEAE Trisacryl M	18
3.4. Chromatographie an Ultrogel Aca 34 und Biogel P200	18
4. Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgel- elektrophorese	19
5. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration	19
6. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz	19
IV. Genetische Methoden	21
1. Isolierung von Mutanten	21
2. Transfer genetischer Marker	22

3. Isolierung von DNS	22
4. Klonierung von DNS-Fragmenten	23
5. Transformation und Transfektion	23
6. Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten	23
7. Expression plasmidkodierter Proteine in Mini- zellen	24
8. DNS-Sequenzierung	24
8.1. Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert	24
8.2. Didesoxynukleotidmethode nach Sanger	25
8.3. Digitale Verarbeitung der ermittelten Nukleotidsequenzen	25
9. Nuklease S1 Kartierung	25
9.1. Extraktion von RNS	25
9.2. Ausbildung von DNS/RNS Hybriden und Abbau mit Nuklease S1	26
10. Hybridisierungsexperimente	26
10.1. Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten und Oligonukleotiden	27
10.2. Hybridisierung von DNS-Fragmenten	27
11.3. Plaquehybridisierung	27
11. Oligonukleotidmutagenese	28
11.1. Präparation eines M13mp9 Derivates	28
11.2. Konstruktion der "gapped-duplex" DNS und Transfektion	29
C. ERGEBNISSE	30
I. Isolierung und Charakterisierung Cystein ausscheidender Mutanten von E.coli	30
1. Isolierung Ethanmethylsulfonsäure induzierter Revertanten von cystein-auxotrophen Stämmen	30
2. "Screening" der Revertanten auf Cysteinaus- scheidung	31
3. Charakterisierung der Cystein überproduzierenden Mutante JM240/33	32
4. Kartierung der zur "Feedbackinsensitivität" der Serin-Acetyltransferas führenden Mutation in JM240/33 durch P1 Transduktion	34

II.	Klonierung und Analyse des Serin-Acetyltransferase Strukturgens $cysE^*$ aus der "feedbackinsensitiven" Mutante JM240/33	36
1.	Konstruktion eines für die Klonierung von $cysE^*$ geeigneten Rezipientenstammes	36
2.	Klonierung des $cysE^*$ -Gens aus JM240/33	39
3.	Hybridisierungsexperimente mit ^{32}P -markiertem BamHI-Restriktionsfragment aus pCys2	40
4.	Physikalische Kartierung des Plasmides pCys2	41
5.	Subklonierung des $cysE^*$ -Gens	42
6.	Sequenzierung des mutierten Strukturgens ($cysE^*$) der Serin-Acetyltransferase	44
7.	Expression des $cysE^*$ -Gens in Minizellen	44
III.	Klonierung und Analyse des Serin-Acetyltransferase Strukturgens $cysE^+$ aus dem Wildtypstamm E.coli KL16	46
1.	Klonierung und Sequenzierung des $cysE^+$ -Gens aus E.coli KL16	47
2.	DNS-Sequenzvergleich der Gene $cysE^*$ und $cysE^+$ und Identifizierung der zur "Feedbackinsensitivität" führenden Mutation	47
3.	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des $cysE^+$ -Gens mit Nuklease S1	51
IV.	Versuche zum gezielten Austausch von Methionin ₍₂₆₅₎ in der Aminosäurekette der Serin-Acetyltransferase gegen Lysin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin	55
1.	Konstruktion eines M13mp9 Derivates und Klonierung des MluI/BstEII Restriktionsfragmentes	57
2.	Oligonukleotidmutagenese	59
3.	"Screening" der Phagenklone auf die gewünschte Mutation	62
4.	Rückklonierung des mutierten MluI/BstEII Fragmentes in pCys2 Δ MluI/BstEII	65
5.	Charakterisierung der Mutanten hinsichtlich Aktivität und Regulation der Serin-Acetyltransferase	66
V.	Anreicherung und Charakterisierung der Serin-Acetyltransferase aus E.coli	68

1. Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus dem Stamm KL16/8 (pWT2)	68
2. Versuche zur Bestimmung der stöchiometrischen Zusammensetzung des Cysteinsynthase-Komplexes	73
3. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Serin-Acetyltransferase Untereinheit aus E.coli	79
VI. Konstruktion eines Cystein-Produzentenstammes und Optimierung der Cysteinproduktion	80
1. Konstruktion des Cystein-Produzentenstammes	80
1.1. Blockieren der Glycinebiosynthese	81
1.2. Blockieren des Cysteinabbaus	83
1.3. Blockieren der Fähigkeit zur recA abhängigen Rekombinationsreparatur und Transformation mit dem Plasmid pCys2	84
2. Versuche zur Optimierung der Cysteinproduktion	86
2.1. Optimierung in der 10 ml Schüttelkultur	86
2.2. Optimierung im 1.5 l Fermenter	91
D. DISKUSSION	95
E. ZUSAMMENFASSUNG	105
F. LITERATURVERZEICHNIS	108

A. EINLEITUNG

Die Aminosäure Cystein wird in *Escherichia* (E.) *coli* und *Salmonella* (S.) *typhimurium* über einen verzweigten, konvergenten Biosyntheseweg synthetisiert (siehe Abbildung 1). Entlang eines Zweiges wird Sulfat in die Zelle aufgenommen, aktiviert und zu Sulfid reduziert. Der andere Biosynthesestadient der Biosynthese und Aktivierung des Serins zu O-Acetyl-L-Serin. Beide Zweige konvergieren an dem Punkt, wo Sulfid mit O-Acetyl-L-Serin zu Cystein und Acetat reagiert.

Die Sulfatreduktion in *E.coli* und *S. typhimurium* ist "assimilatorisch" in dem Sinne, daß sie der Versorgung der Zelle mit reduziertem Schwefel für biosynthetische Zwecke dient. Die Aufnahme von anorganischem Sulfat benötigt ein Transportsystem, das in *E.coli* und *S.typhimurium* zumindest teilweise durch die Genprodukte der *cysA* Region konstituiert wird (Mizobuchi et al., 1962; Dreyfuss, 1964; Jones-Mortimer, 1968a). Dieses Transportsystem ermöglicht auch die Aufnahme von Selenat, Selenit, Molybdat und Chromat (Pardee et al., 1966; Lindblow-Kull et al., 1985).

Der Reduktion von Sulfat zu Sulfid geht eine zweistufige Aktivierung des Sulfats voraus (Pasternak, 1962; Dreyfuss und Monty, 1963a). Zunächst reagiert ATP mit Sulfat unter der Katalyse des Enzyms Sulfat-Adenylyltransferase zu dem gemischten Anhydrid Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS). Im 2. Schritt, katalysiert durch das Enzym Adenylylsulfat-Kinase, wird Adenosin-5'-Phosphosulfat an der 3'-Position zu 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) phosphoryliert. Die Strukturgene der Sulfat-Adenylyltransferase und Adenylylsulfat-Kinase, *cysD* und *cysC* respektive, liegen auf dem

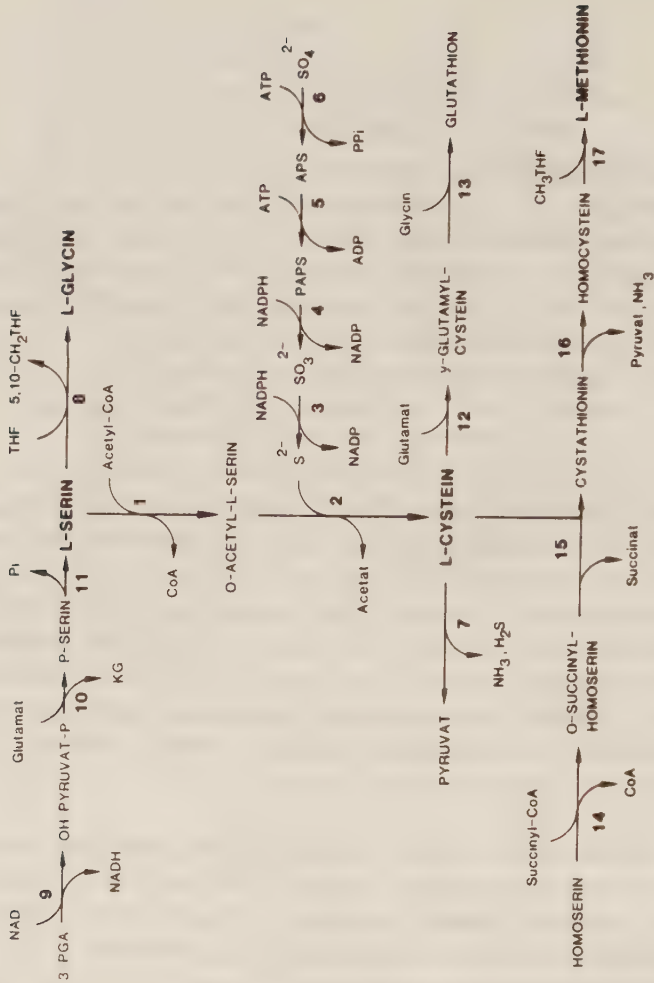


Abbildung 1:

Schema der Biosynthese von Serin, Glycin, Methionin und Cystein

Abbildung 1 (Forts.):

Enzyme	E.C.	Gensymbole ^a
1 = Serin-Acetyltransferase	2.3.1.30	cysE
2 = O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase	4.2.99.8	cysK,M
3 = Sulfit-Reduktase	1.8.1.2	cysG,I,J
4 = Adenylylsulfat-Reduktase	1.8.99.2	cysH
5 = Adenylylsulfat-Kinase	2.7.1.25	cysC
6 = Sulfat-Adenylyltransferase	2.7.7.4	cysD
7 = Cystein-Desulphydrase	4.4.1.1	
8 = Serin-Hydroxymethyltransferase	2.1.2.1	glyA
9 = Phosphoglycerat-Dehydrogenase	1.1.1.95	serA
10 = Phosphoserin-Aminotransferase	2.6.1.52	serC
11 = Phosphoserin-Phosphatase	3.1.3.3	serB
12 = γ -Glutamylcystein-Synthase	6.3.2.2	gshA
13 = Glutathion-Synthetase		gshB
14 = Homoserin-Succinyltransferase	2.3.1.46	metA
15 = Cystathionin- γ -Synthase	4.2.99.9	metB
16 = Cystathionin- β -Lyase	4.4.1.1	metC
17 = Homocystein-Methylase	2.1.1.14	metE
" (Vitamin B abhängig)	2.1.1.13	metH

^a (Bachmann, 1983)

Chromosom dicht nebeneinander (Abb. 2), (Dreyfuss und Monty, 1963a; Jones-Mortimer, 1968a; Kredich, 1971).

3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat wird in zwei reduktiven Schritten, die durch die Enzyme Adenylylsulfat-Reduktase (cysH) und Sulfit-Reduktase (cysG, cysI, cysJ) katalysiert werden, zu Sulfid reduziert (Jones-Mortimer, 1968a; Kredich, 1971). In E.coli und S.typhimurium scheinen die Reaktionsprodukte Sulfit und Sulfid frei vorzuliegen und nicht, wie z.B. im Chlorellasystem, an einen Träger gebunden zu sein (Schmidt et al., 1974; Tsang und Schiff, 1976b; 1978).

Der direkte Vorläufer von Cystein, O-Acetyl-L-Serin, entsteht in einer Acetyl-CoA abhängigen Aktivierung des Serins,

katalysiert durch das Enzym Serin-Acetyltransferase (Kredich und Tomkins, 1966; Kredich et al., 1969). Die anschließende Sulfhydrierung des O-Acetylserins zu Cystein und Acetat wird durch das Enzym O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase katalysiert.

In *S.typhimurium* sind beide Enzyme in einem bifunktionalen Enzymkomplex, der Cysteinsynthase, mit einem Molekulargewicht von etwa 300 000 Da assoziiert. Für den Komplex wurde ein Aufbau aus 1 Molekül Serin-Acetyltransferase mit einem Molekulargewicht von 160 000 Da und 2 Molekülen O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase mit einem Molekulargewicht von je 68 000 Da diskutiert (Kredich et al., 1969). Becker et al. (1969) konnten zeigen, daß die O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase ein Homodimer ist, deren Untereinheiten ein Molekulargewicht von 34 000 Da besitzen und je 1 Molekül Pyridoxalphosphat gebunden haben. Die exakte Untereinheitenstruktur der Serin-Acetyltransferase konnte bisher nicht aufgeklärt werden.

Ein interessantes Phänomen des Cysteinsynthase-Komplexes ist seine Dissoziation in die beiden Enzymaktivitäten in Anwesenheit von O-Acetyl-L-Serin. Die Dissoziation des Komplexes ist reversibel und wird durch Sulfid gehemmt (Kredich et al. 1969). Die Aggregation von Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase hat Anlaß zu Spekulationen über ihre funktionelle Bedeutung gegeben (Kredich, 1969, Cook und Wedding, 1977a; 1978). Möglicherweise bietet der Komplex einen kinetischen Vorteil bei der Umwandlung von Serin in Cystein durch das Herabsetzen der Distanz, die O-Acetyl-L-Serin auf dem Weg von einem aktiven Zentrum zum anderen zurücklegen muß (Cook und Wedding, 1977a).

Die am Aufbau der Cysteinsynthase beteiligte O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase, kodiert durch den Genort *cysK*, wird in *S.typhimurium*, nicht in *E.coli*, als O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase A bezeichnet. In diesem Organismus existiert zusätzlich ein Genort *cysM*, der für eine O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase B codiert. Dieses Enzym katalysiert dieselbe

Reaktion wie die O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase A, ist jedoch nicht im Komplex mit der Serin-Acetyltransferase assoziiert und unterscheidet sich in Antigenität und chromatographischem Verhalten von dieser. Diskutiert wird eine physiologische Rolle der O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase B unter anaeroben Bedingungen, da *cysK* Mutanten von *S.typhimurium* unter anaeroben Bedingungen cystein-prototroph, *cysM* Mutanten dagegen "cystein-bradytroph" sind. Einen Einfluß der Anaerobiose auf die Cysteinbiosynthese zeigt auch die Tatsache, daß *cysB* (Regulatorgen), *cysI* und *cysJ* Mutanten unter einer Atmosphäre von 95 % H_2 und 5 % CO_2 mit Sulfat als alleiniger Schwefelquelle wachsen können. *CysA*, *cysC*, *cysD*, *cysE*, *cysG*, und *cysH* Mutanten bleiben unter diesen Bedingungen cystein-auxotroph (Barret und Chang, 1979). Offensichtlich wird unter anaeroben Bedingungen (i) eine Sulfit-reduktase gebildet, welche nicht durch die Gene *cysI* und *cysJ* spezifiziert ist, und (ii) die Regulation der Cysteinbiosynthese von der Aktivität des *cysB* Genprodukts entkoppelt.

Die Serin-Acetyltransferase ist das regulatorische Schlüsselenzym der Cysteinbiosynthese, da (i) ihre Aktivität einer strikten Kontrolle durch das Endprodukt unterliegt (Kredich und Tomkins, 1966; Kredich et al., 1969; Cook und Wedding, 1978) und (ii) ihr Reaktionsprodukt O-Acetyl-L-Serin den Induktor für die Derepression aller auf dem Chromosom verstreut liegender Cysteinbiosynthesegene mit Ausnahme von *cys B*, *cysE* und *cysG* darstellt (siehe Abbildung 2) (Spencer et al., 1967; Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971). Cystein kontrolliert somit nicht nur die Biosynthese seines Kohlenstoffskelett Vorläufers O-Acetyl-L-Serin, sondern darüberhinaus auch die Expression der Gene für die Sulfat-reduktion. Neben dem internen Induktor O-Acetyl-L-Serin ist für die Derepression des Cysteinregulons (= Gesamtheit aller Cysteingene, die dieser Regulation unterliegen) die Anwesenheit eines intakten *cysB* Genprodukts sowie Cysteinmangel

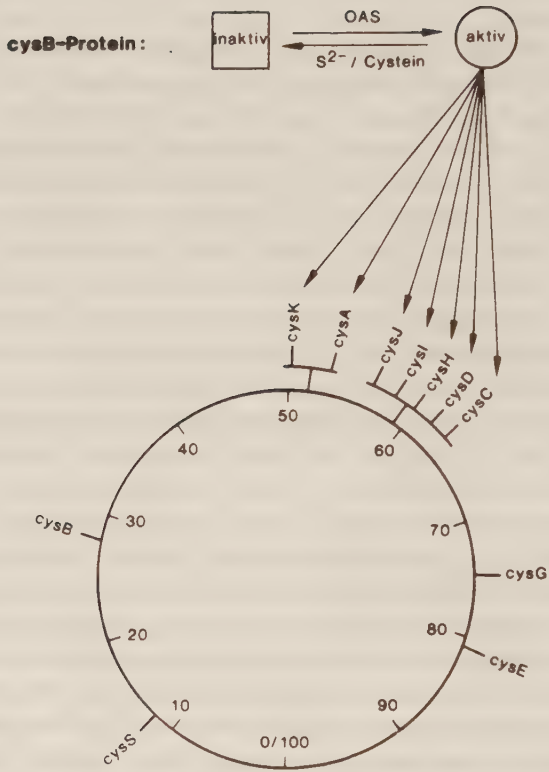


Abbildung 2:

Das Cysteinregulon: Lokalisation der Cysteinbiosynthesegene auf dem Chromosom

notwendig. Überschuß an Cystein oder Sulfid führt zur Repression des Cysteinregulons (Spencer et al., 1967,; Jones-Mortimer, 1968b, Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971). Das von Kredich 1983 entworfene Modell des Cysteinregulons beschreibt das Gegenspiel des Induktors O-Acetyl-L-Serin und der Repressoren Cystein bzw. Sulfid als eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen aktiviertem und inaktivierten *cysB* Protein. Das aktivierte Regulatorprotein dereprimiert dann die einzelnen Biosynthesegene dieses Regulons auf differenzielle Weise (Pasternak et al., 1965; Jones-Mortimer et al., 1968; Kredich, 1971) (siehe Abbildung 2). Die Expression des Strukturgens der Serin-Acetyltransferase *cysE* ist dagegen konstitutiv (Jones-Mortimer et al., 1968, Kredich, 1971), die des *cysB*-Gens scheint einer Autoregulation zu unterliegen (Jagura-Burdzy und Hulanicka, 1981).

Das Zusammenwirken von Endprodukthemmung, Repression, Induktion und Autoregulation in der Kontrolle der Cysteinbiosynthese von *E.coli* und *S.typhimurium* sowie die zentrale Stellung dieser Aminosäure im Intermediärstoffwechsel macht eine Überproduktion von Cystein sehr schwierig. Nicht zuletzt darin dürfte der Grund liegen, daß Cystein eine der wenigen Aminosäuren ist, für die bisher noch kein wirtschaftlich interessantes fermentatives Produktionsverfahren entwickelt werden konnte.

Die Produktion von L- und D,L-Cystein, die weltweit im Jahre 1982/83 etwa 800 Tonnen mit einem Marktwert von ca. 20 Mio \$ betrug (G.Schmid, persönliche Mitteilung), erfolgt bisher entweder durch chemische Synthese (Degussa) oder durch Extraktion aus menschlichen Haaren (Diamalt, Sun Orient, Nippon Protein). Der größte Markt für Cystein mit ca. 250 to/Jahr liegt im Bereich der Kosmetik. Hier wird Cystein vornehmlich zur Bereitung von Dauerwellenlotionen benötigt. In der Lebensmittelindustrie wird Cystein als Antioxydationsmittel für ungesättigte Geschmackskomponenten, als Geschmacksverstärker und zur Bereitung von Brot verwendet. Zusatz von Cystein zum Brotteig bewirkt eine deutliche

Erleichterung beim Bearbeiten des Teiges durch Brechen der Sulfhydrylgruppen des Klebereiweißes. Cystein und einige seiner Derivate wie z.B. N-Acetylcystein und Methylcystein sind Bestandteile einer Reihe von Medikamenten die zur Behandlung von Hautkrankheiten, Leberzirrhose und Erkrankungen des Respirationstraktes eingesetzt werden. Die Wirkung von Cystein beruht entweder auf der Steigerung der Kera-tinisierung oder der Verflüssigung von Schleim.

In den nächsten Jahren ist eine Steigerung des Bedarfs an Cystein von 5-7% zu erwarten. Schätzungen nach soll im Jahre 1990 der Cysteinausstoß weltweit etwa 1200 - 1400 Tonnen betragen (G.Schmid, persönliche Mitteilung). Auf Grund des ständig steigenden Bedarf an Cystein zusammen mit der Verknappung des Rohmaterials für die Extraktion bei europäischen Anbietern wurde die Suche nach alternativen, v.a. mikrobiologischen Produktionsverfahren für Cystein intensiviert.

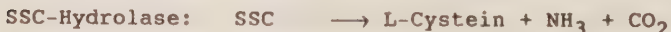
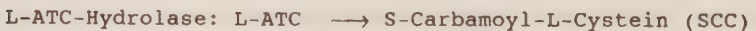
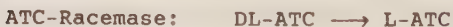
Bisher wurden zwei enzymatische Verfahren und eine fermentative Methode entwickelt und patentiert. Ihre Anwendung ist jedoch auf Grund zu hoher Kosten der Ausgangsstoffe bzw. einer zu geringen Ausbeute wirtschaftlich noch nicht interessant. Es handelt sich dabei um folgende drei Verfahren:

- (i) Einsatz des Enzyms Cystein-Desulphydrase. Das Enzym, das im Bakterienreich sehr weit verbreitet ist, katalysiert neben der reversiblen α, β Eliminierungsreaktion



auch eine reine β -Eliminierung. Diese wird zur Synthese von Cystein aus β -Chloro-L-Alanin und Na_2S ausgenutzt (Yamada et al., 1976).

- (ii) Umwandlung der Verbindung 2-Aminothiazolin-4-Carboxylsäure (ATC) in L-Cystein durch drei bakterielle Enzyme (Sano et al., 1977).



- (iii) Fermentative Produktion von Cystein mit "Paracolobactrum coliforme KY 8482" bei 30°C in einem glucosehaltigen Salzmedium. Nach 96 Stunden Fermentationsdauer wurden 150 mg/l Cystein akkumuliert (Furuya et al., 1979).

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war zweigeteilt. Einerseits sollte eine Mutante von E.coli isoliert und charakterisiert werden, deren Serin-Acetyltransferase nicht oder nur mehr vermindert durch L-Cystein gehemmt wird; andererseits sollte aufbauend auf diese Ergebnisse versucht werden einen Cysteinüberproduzenten zu entwickeln.

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Mikrobiologische Methoden

1. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

Tabelle 1: Escherichia coli Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
JM240	Hfr, proC47, cys-54, supE42	CGSC ^a 5180
JM240/33	Hfr, proC47, cys-54, supE42, cysE*	diese Arbeit
JM240/331	wie JM240/33, glyA::Mud1	"
JM240/332	wie JM240/33, ΔglyA	"
JM240/333	wie JM240/33-2, cyd::Mud1	"
JM240/334	wie JM240/33-2, Δcyd	"
JM240/335	wie JM240/33-4, recA56, srl-300::tn10	"
JM39	F ⁺ , cysE51, tfr-8	CGSC 5043
JM39/2	F ⁺ , cysE51	diese Arbeit
JM39/4	F ⁺ , cysE51, srl-300::tn10, recA56	"
JM39/5	F ⁺ , cysE51, recA56	"
JM39/24	F ⁺ , cysE51, recA56, hsdR2	B. Veprek
AC1	F ⁻ , cysE52, argH1	Laborsammlung
KL19	Hfr	CGSC 4290
KL16	Hfr, thi-1	Laborsammlung
KL16/8	Hfr, thi-1, srl-300::tn10, recA56	"

JC10240	Hfr,thr-300,recA56, srl-300::tn10,relA1,ilv-318, spoT1,thi-1,rpsE2300	CGSC 6074
DS410	F ⁻ ,ara-13,azi-8,tonA2, minA1,minB2,gai-6,xyl-7, mtl-2,thi-1,rpsL135	Dougan und Sherratt (1977)
Mal103	Δ (proA-lac),thi-1,rpsL, Mu cts,Mu d (Ap ^R ,lac)	Casadaban und Cohen (1979)
JF1130	F ⁻ ,leuB6,thi-1,proA2, his4,argE3,pyrE,lacY, galK2,xyl-5,mtl-1,chlG6, strA31,supE44	CGSC 5567
JM101	supE,thi, Δ (lac-proAB), F'(traD36,proAB,lacI ^q , Z Δ M15)	Yanish-Peron et al., (1985)
JM109	recA1,endA1,gyrA96,thi, hsdR17,supE44,relA1, λ^- , Δ (lac-proAB), F'(traD36, proAB,lacI ^q ,Z Δ M15)	Yanish-Peron et al., (1985)
HB101	F ⁻ ,hsdS20,recA1,supE44,lacY1 ara-14,gaiK2,xyl-5,mtl-1, leuB6,proA2,thi-1,rpsL20	Boyer und Roulland-Dussoix (1969)
WA321	F ⁻ ,thi-1,leuB6,proA2,argE3, his-4,lacY1,gaiK2,ara-14, xyl-5,mtl1,rpsL31,tsx-33, supE44,dam-4, λ^-	Laborsammlung
MK30-3	recA,gaiE,strA, Δ (lac-proAB) F'(lacI ^q ,proAB,Z Δ M15)	Kramer et al., (1984)
BMH71-18mutS	supE,thi, Δ (lac-proAB), mutS215::Tn10,F'(lacI ^q , proAB,Z Δ M15)	Kramer et al., (1984)

^a E.coli Genetic Stock Center

Tabelle 2: Bakteriophagen

Phage	Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
Plkc		Laborsammlung
PlCmc1r	cam	"
M13mp9	amber	Messing et al. (1981)
M13mp9'	amber	diese Arbeit
M13mp9cys	amber	"
M13mp19		Yanish-Peron et al., (1985)

Tabelle 3: Plasmide

Plasmid	Größe (kb)	vermittelte Resistenz bzw. maßgeblicher Genotyp	Referenz bzw. Herkunft
pBR322	4.36	amp, tet	Bolivar et al., (1977)
pWT2	8.0	amp, cysE ⁺	diese Arbeit
pCys2	8.0	amp, cysE [*]	"
pCys3	7.4	amp, cysE [*]	"
pCys4	6.9	amp, cysE [*]	"
pCys5	6.5	amp	"
pCys6	5.8	amp	"
pWT2'	8.0	amp, cysE ⁺	"
pCys2'	8.0	amp, cysE [*]	"
pA4-6	8.0	amp, cysE(AAA ₂₅₆)	"
pC2-9	8.0	amp, cysE(GAA ₂₅₆)	"

2. Medien und Anzuchtbedingungen

Folgende Medien wurden verwendet (Angaben pro l):

Luria - Bertani Broth	Trypton	10.0	g
(LB; Miller, 1972)	Hefeextrakt	5.0	g
	NaCl	10.0	g

CM - Salzmedium:	Na_2HPO_4	7.0	g
	KHPO_4	3.0	g
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0	g
	MgSO_4	0.2	g
	CaCl_2	0.011	g

Dem Basalmedium wurde 1 ml Spurenelementlösung (Neidhardt et al., 1974) folgender Zusammensetzung zugegeben:

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.003	mM
H_3BO_3	0.4	mM
CoCl_2	0.03	mM
CuSO_4	0.01	mM
MnCl_2	0.08	mM
ZnSO_4	0.01	mM

Feste Nährmedien enthielten entweder 15 g Agar (LB), 12,5 g Agar (CM) oder 6 g Agar (Weichagar). Supplemente wurde den Medien nach dem Autoklavieren in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Glucose: 4 g bzw. 10 g für Cysteinproduktions-Versuche
 Aminosäuren: 40 mg bzw. 100 mg für Cysteinproduktions-Versuche
 Nukleotide: 20 mg
 Vitamine: 5 mg

Zur Herstellung von Selektivmedien wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugegeben:

Ampicillin (Serva)	30 g bzw. 100 g
Tetracyclin (Boehringer Mannheim)	10 g
Chloramphenicol (Sigma)	30 g

Anzuchten von E. coli Stämmen in Flüssigmedium erfolgten in Wasserbadschüttlern (Modell G76, New Brunswick Scientific) bei definierter Temperatur oder in einem auf 37°C temperierten Brutraum auf Tischrundschüttlern (Modell TR1, Braun Melsungen) sowie im Rollodrum (Modell TC-7 New Brunswick Scientific).

Fermenteranzuchten wurden entweder im 1,5 l Fermenter (Braun Melsungen Biostat M) oder im 50 l Fermenter (Braun Melsungen U 50 D) durchgeführt.

II. Quantitative Bestimmungsmethoden

1. Bestimmung von Cystein

Die quantitative Bestimmung der Cysteinkonzentration im Kulturüberstand erfolgte nach der Methode von Gaitonde (1967) mit den von Krauss (1984) vorgeschlagenen Modifikationen. Die semiquantitative Bestimmung der Cysteinausscheidung (Kreuzfütterungstest) wurde durchgeführt auf CM-Agar, der mit 1% Glukose und den entsprechenden Aminosäuren supplementiert und mit 5×10^6 Zellen des cystein-auxotrophen Indikatorstammes AC1 pro ml beimpft war. Der Radius des Fütterhofes um die Testkolonie (= Halo) wurde als semiquantitatives Maß für die Cysteinausscheidung durch den Teststamm genommen.

2. Bestimmung von Protein

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Lowry et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

III. Proteinchemische und enzymatische Methoden

1. Präparation von Rohextrakten für die Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität

500 ml CM-Medium mit den entsprechenden Supplementen wurden mit einer Übernachtskultur auf eine optische Dichte bei 420 nm (O.D.₄₂₀) von 0.05 angeimpft. Nach Erreichen einer O.D.₄₂₀ von etwa 0.8 wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min bei 6000 x g), in eiskaltem 50 mM Tris/CL pH 7.5 gewaschen und bis zu ihrer Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Nach Auftauen der Zellen und Resuspendieren in 1.5 Volumen 50 mM Tris/CL pH 7.5, 2 mM Dithiothreitol, 0.5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µg/ml DNase I (Reinheitsgrad 2) erfolgte der Aufbruch der Zellen bei 110.4 MPa in einer French Pressure Zelle (American Instruments Company).

Das Homogenat wurde 30 min bei 30 000 x g zentrifugiert und der Überstand (S30-Extrakt) unverzüglich zur Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität verwendet. Die enzymhaltigen Extrakte wurden wegen der Kälteelabilität der Serin-Acetyltransferase (Kredich, 1969) bei Raumtemperatur gehandhabt.

2. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.1. Serin-Acetyltransferase Test

Die Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität erfolgte im wesentlichen nach der von Kredich und Tomkins (1966) beschriebenen Methode in einem Gilford 2600 Spektralphotometer. Das Testgemisch enthielt 50 mM Tris/CL pH 7.6, 1 mM L-Serin, 0.1 mM Acetyl-Coenzym A und eine entsprechende Mengen Enzym. Das Endvolumen betrug 1 ml. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und über die Abnahme der Absorption bei 232 nm, die durch Spaltung der Thioesterbindung im Acetyl-CoA hervorgerufen wird, verfolgt. Hemmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität wurde in Anwesenheit verschiede-

dener Konzentrationen von L-Cystein in demselben Reaktionsansatz getestet. In einem parallelen Ansatz ohne L-Serin wurde die unspezifische Spaltung von Acetyl-Coenzym A bestimmt und von der Reaktionsrate mit L-Serin subtrahiert. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde ein Absorptionskoeffizient für Acetyl-Coenzym A von $6.5 \text{ cm}^2 \times \mu\text{Mol}^{-1}$ zugrunde gelegt.

2.2. O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase Test

Die Aktivität der O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase wurde in Anlehnung an die von Fimmel und Loughlin (1977) beschriebene Methode in verschließbaren 5 ml Ampullen (N 20-5/4 Machery-Nagel) bestimmt. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 1 ml 10 mM Tris/CL pH 7.5, 0.2 mM Dithiothreitol, 60 μM EDTA in 10 mM Tris/CL pH 7.5, 30 mM O-Acetyl-L-Serin, 20 mM Natriumsulfid und eine geeignete Menge Enzym. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Das gebildete Cystein wurde nach Gaitonde (1967) bestimmt.

2.3. Aminoacyl-tRNS-Synthetase Test

Die enzymatische Aktivität der Aminoacyl-tRNS-Synthetasen wurde mit Hilfe der Acylierung von tRNS mit ^{14}C -markierten Aminosäuren nach der Methode von Kosakowski und Böck (1970) bestimmt.

2.4. Cystein-Desulphydrase Test

Die Bestimmung der Cystein-Desulphydrase Aktivität ganzer Zellen erfolgte durch Messung der H_2S Produktion aus L-Cystein mit der colorimetrischen Methode von Siegel (1965).

3. Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus *E. coli*

Für die Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus *E. coli* wurde die von Kredich et al. (1969) beschriebene Methode für die Reinigung der Cysteinsynthase aus *S. typhimurium* modifiziert. Wegen der Kälteinstabilität des Enzyms wurden alle Reinigungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1. Präparation der S30- und S100-Extrakte

Der plasmidhaltige Stamm *E. coli* KL16/8 (pWT2) wurde im Biostat U 50 D Fermenter in 50 l CM-Medium mit entsprechenden Supplementen bis zu einer O.D.₄₂₀ von etwa 1 angezogen. Die Zellen wurden in einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia) gesammelt, mit eiskaltem 50 mM Tris/CL pH 7.6 gewaschen und in 1.5 Volumen Puffer A (50 mM Tris/CL pH 7.6, 10 mM MgSO₄, 30 mM NH₄CL, 2 mM Dithiothreitol, 0.5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 µg/ml DNase I (Reinheitsgrad 2) resuspendiert. Der Aufbruch der Zellen geschah über zwei Passagen durch die French Pressure Zelle (American Instruments Company) bei 82.8 MPa. Durch Zentrifugation, erst 30 min bei 30 000 x g und anschließend 2 h bei 100 000 x g, wurden der S30- bzw. der S100-Extrakt erhalten.

3.2. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Dem S100-Extrakt wurde zunächst fein gepulvertes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 35 % zugegeben. Der nach einer Stunde gebildete Niederschlag wurde 10 min bei 13 000 x g abzentrifugiert. In dem Überstand wurde durch weitere Zugabe von Ammoniumsulfat die Sättigung auf 50 % erhöht. Das präzipitierte Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 13 000 x g) gesammelt und in 15 ml Puffer B (110 mM Tris/Cl pH 7.6, 20 µM L-Cystein, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA) resuspendiert. Der Proteinextrakt wurde dreimal gegen 2 l Puffer B dialysiert.

3.3. Chromatographie an DEAE Trisacryl M

Der dialysierte Extrakt wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte DEAE Trisacryl M Anionenaustauschersäule (22 cm x 7 cm²) mit einer Flußrate von 30 ml/h aufgepumpt. Die Säule wurde mit Puffer B solange nachgewaschen, bis alles Protein, das nicht an die Säule bindet, eluiert worden war. Die Detektion des Proteins erfolgte bei 280 nm über ein Durchflußphotometer (LKB Uvicord S) in Verbindung mit einem Flachbettsschreiber (LKB 2210). Anschließend wurde das an die Säule gebundene Protein durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 - 0.5 M in Puffer B mit einer Flußrate von ebenfalls 30 ml/h eluiert. Die Serin-Acetyltransferase Aktivität enthaltenden Säulenfraktionen wurden vereint und das Protein durch Zugabe von 600 g/l festen Ammoniumsulfats präzipitiert.

3.4. Chromatographie an Ultrogel Aca 34 und Biogel P200

Der Niederschlag wurde in 3 ml Puffer C (100 mM Tris/CL pH 7.6, 20 µM L-Cystein, 2 mM Dithiothreitol und 1 mM EDTA) gelöst und mit einer Flußrate von 6 ml/h auf eine Ultrogel Aca 34 Gelsiebsäule (85 cm x 7 cm²) aufgepumpt. Die Elution der Proteine erfolgte mit Puffer C und einer Flußrate von ebenfalls 6 ml/h. Die Serin-Acetyltransferase Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden wieder vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon, Membran XM 30) auf ein Volumen von etwa 2 ml eingeengt.

Der Proteinextrakt wurde auf eine mit Puffer D (50 mM Natriumphosphat pH 6.8, 250 mM NaCl, 10µM L-Cystein, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA und 50 mM O-Acetyl-L-Serin) äquilibrierte Biogel P 200 Gelsiebsäule (85 cm x 7 cm²) aufgepumpt (Flußrate: 6 ml/h). Das Protein wurde mit Puffer D bei einer Flußrate von ebenfalls 6 ml/h eluiert. Die Serin-Acetyltransferase Aktivität zeigenden Fraktionen wurden wieder vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon Membran PX 10) eingeengt. Der Extrakt wurden unter denselben

Bedingungen, jedoch ohne O-Acetyl-L-Serin im Puffer, über eine Biogel P200 Säule rechromatographiert.

4. Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die eindimensionale Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurde nach Lämmli (1970) durchgeführt. Zum Anfärben der Proteine wurde entweder 0.2 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva) oder 0.1 % Amidoschwarz CB (Serva) in 30 % Methanol und 10 % Essigsäure verwendet.

5. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte von Cysteinsynthase, Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase wurde über Gelfiltration (AcA 34 Ultrogel Säule; Säulenmaße: 85 cm x 7 cm²) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde entweder Puffer D (50 mM Natriumphosphat, 250 mM NaCl, 10 µM L-Cystein, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA und 50 mM O-Acetyl-L-Serin) oder Puffer E (= Puffer D ohne O-Acetyl-L-Serin) verwendet. Die Flußrate betrug konstant 6 ml/h. Das Ausschlußvolumen der Säule ($V_0 = 186$ ml) wurde mit Dextranblau und Puffer E als Laufpuffer bestimmt. Das Gesamtvolumen der Säule V_T ergab sich aus der Summe von Gelbettvolumen und dem Ausschlußvolumen V_0 . Nach Chromatographie der S30 Rohextrakte des Stammes KL16/8 (pWT2) unter dissoziierenden (Puffer D) und nicht dissoziierenden (Puffer E) Bedingungen wurde aus den gemessenen Elutionsvolumina V_E der Eich- und Testproteine und den Säulen spezifischen Daten der jeweilige durchschnittliche Verteilungskoeffizient K_{AV} nach der Formel $K_{AV} = (V_E - V_0) V_T^{-1}$ errechnet. Aus der semi-logarithmischen Auftragung der K_{AV} -Werte gegen die Molekulargewichte der Eichproteine wurden die Molekulargewichte der Testproteine Cysteinsynthase, Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase ermittelt. Als Eichproteine wurden die im S30-Extrakt enthaltenen Aminoacyl-tRNS-Synthetasen für Phenylalanin (MG: 270 000 Da), Threonin (MG:

160 000 Da), Isoleucin (MG: 110 000 Da) und Cystein (MG: ca. 50 000 Da) verwendet, deren Aktivitäten, wie in Punkt III.2.3. beschrieben, bestimmt wurden.

6. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Serin-Acetyltransferase aus *E. coli* wurde nach der von Chang et al. (1978) beschriebenen Methode durchgeführt. Etwa 6 nMol der gereinigten Serin-Acetyltransferase wurden in 40 µl konzentriertem Pyridin in Edman Röhrchen gelöst und in die Sequenzreaktionen eingesetzt. Zur Kontrolle wurde die Sequenz der Proteine Bradykinin und Lysozym bestimmt. Bei jedem Sequenzierschritt wurde zunächst 4 NN-Dimethyl-Aminoazobenzol-4-isothiocyanat (DABITC) und anschließend Phenylisothiocyanat (PITC) zur Kopplung verwendet. Das entstandene Thiocarbamylderivat der N-terminalen Aminosäure wurde mit wasserfreier Trifluoressigsäure abgespalten und mit 50 % Trifluoressigsäure zur Thiohydantoin-aminosäure (DABTH-Aminosäure) konvertiert. Die Auftrennung der DABTH-Aminosäuren erfolgte durch zweidimensionale Chromatographie auf 2.5 cm x 2.5 cm Micropolyamid-Folien (Schleicher und Schüll). Als Laufmittel wurden in der 1. Dimension Eisessig : Wasser (1 : 2) und in der 2. Dimension Toluol : n-Hexan : Eisessig (2 : 1 : 1) verwendet. Durch Behandlung der Folien mit HCL Dampf erschienen die DABTH-Aminosäuren als rote Flecken. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte mit Hilfe des von Chang et al. (1978) veröffentlichten Schemas.

IV. Genetische Methoden

1. Isolierung von Mutanten

1.1. Revertanten cystein-auxotropher Stämme

Revertanten von cystein-auxotrophen Stämmen wurden nach Mutagenese mit Ethanmethylsulfonsäure (EMS) (Miller, 1972) auf cystein-freiem Minimalmedium isoliert.

1.2. Deletionsmutanten

Zunächst wurde durch Hitzeinduktion von E.coli Mal103 (Mud1, Mu^{ts}) ein Mu-Phagen Lysat präpariert und damit der zu mutagenisierende Stamm infiziert (Casadaban und Cohen 1979). Die Mu-lysogenen Mutanten wurden entweder direkt oder nach Gegenselektion mit Streptozotozin (Lengeler, 1979) auf ampicillin-haltigen (30 µg/ml) LB-Medium bei 30°C selektiert. Das Screening der Mutanten auf den gewünschten Phänotyp erfolgte ebenfalls bei 30°C auf entsprechenden Testplatten.

Die Exzission der Phagen aus dem Chromosom geschah durch Hitzeinduktion. Dazu wurden die Mu-lysogenen Mutanten, die den gewünschten Phänotyp aufwiesen, in LB-Medium mit Ampicillin (30 µg/ml) bei 30°C bis zu einer O.D.₄₂₀ von etwa 1 angezogen. 0.1 ml dieser Kultur bzw. verschiedener Verdünnungen wurden mit 3 ml LB-Weichagar vermischt, auf LB-Agar ausgegossen und bei exakt 43°C über Nacht inkubiert (F. Zinoni, persönliche Mitteilung). Die auf klarem Hintergrund erscheinenden hitzeresistenten Klone wurden auf Ampicillin-Sensitivität und den gewünschten Phänotyp getestet.

1.3. Plkc sensitive Mutanten

Die Isolierung Plkc sensitiver Abkömmlinge von Plkc resistenten Mutanten erfolgte mit dem Phagen PlCmclr nach der von Goldberg et al. (1974) beschriebenen Methode.

1.4. Tetracyclin-sensitive Klone

Tetracyclin-sensitive Abkömmlinge tetracyclin-resistenter Klone wurden nach der Methode von Maloy und Nunn (1981) auf fusarsäure-haltigen Medien isoliert.

2. Transfer genetischer Marker

Transduktionen mit dem allgemein transduzierenden Phagen Plkc und Konjugationen wurden nach Miller (1972) durchgeführt. Der Test auf $recA^-$ Phänotyp erfolgte durch Exposition in UV-Licht (Maniatis et al. 1982).

3. Isolierung von DNS

Chromosomale DNS wurde nach der Methode von Saito und Miura (1963) präpariert, jedoch mit einer zusätzlichen Phenolextraktion und einer anschließenden isopyknischen CsCl-Dichtegradientenzentrifugation.

Plasmidschnellisolierungen und Großpräparationen von Plasmid-DNS wurden über alkalische Lysis (Birnboim und Doly, 1979), mit den von Maniatis et al. (1982) empfohlenen Modifikationen, durchgeführt.

Doppelsträngige DNS des Phagen M13 wurde nach Clewell und Helinski (1969) präpariert. Die Isolierung der einzelsträngigen Phagen-DNS erfolgte nach der Methode von Walker und Gray (im Druck).

4. Klonierung von DNS-Fragmenten

Vektorplasmid und zu klonierende Spender-DNS wurden mit Restriktionsenzymen unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Um eine Rezirkularisierung des Vektorfragmentes ohne Insert zu verhindern wurden gegebenenfalls die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Ullrich et al. 1977).

Für die Ligation wurde Vektor-DNS und Spender-DNS in äquimolarem Verhältnis gemischt und über Nacht in 20 mM Tris/CL pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM Dithiothreitol, 0.6 mM ATP mit T4 DNS-Ligase bei 14°C inkubiert.

5. Transformation und Transfektion

Die Transformation von E.coli Stämmen mit Plasmid-DNS oder Ligationsansätzen wurde nach Cohen et al. (1977) durchgeführt. Zur Steigerung der Transformationsfrequenz wurden in einigen Fällen die kompetenten Zellen über einen längeren Zeitraum (max. 24 h) in Eis aufbewahrt (Dagert und Ehrlich, 1979). Transfektion von E.coli JM101 und JM109 mit einzel- oder doppelsträngiger M13 DNS erfolgte nach Messing (1983).

6. Agarosegelelektrophorese und Isolierung von DNS-Fragmenten

DNS-Fragmente wurden in horizontalen, 0.6 - 1.2%-igen Agarosegelen bei 5-10 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Gel und Laufpuffer wurde TBE-Puffer (90 mM Tris/CL, 90 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA pH 8.3) nach Peacock und Dingman (1969) verwendet. Zum Auftrag wurde den Proben "Agarosebeads" nach Schaffner (1976) zugegeben. Die Isolierung von DNS-Fragmenten aus "low melting" Agarose (Sigma Typ VII) nach Elektrophorese bei 4°C unter den oben angegebenen Bedingungen erfolgte wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben.

7. Expression plasmidkodierter Proteine in Minizellen

Die Isolierung und Markierung von Minizellen des Stammes DS410 wurde im wesentlichen nach Christen et al., (1983) durchgeführt. Die Herstellung des Saccharosegradienten geschah durch einmaliges Einfrieren und Auftauen einer M9-Salzlösung (Miller, 1972), die 20 % Saccharose enthielt. Die Minizellsuspension wurde auf den Gradienten aufgetragen und 20 min bei 5 000 rpm in einem Sorvall SW 27 Rotor zentrifugiert. Die in einer Bande angereicherten Minizellen wurden mit Hilfe eines Densiflow-Gerätes (Buchler) und einer peristaltischen Pumpe (LKB) aus dem Gradienten gewonnen. Durch Zentrifugation (15 min bei 8 000 x g) wurden die Minizellen gesammelt, in M9-Puffer resuspendiert und durch Filtration über Whatman GF-Filter von kontaminierenden vegetativen Zellen abgetrennt.

8. DNS-Sequenzierung

8.1. Chemische Spaltung nach Maxam und Gilbert (1980)

Für die DNS-Sequenzierung nach Maxam und Gilbert wurden jeweils ca. 10 µg Plasmid-DNS mit einem geeigneten Restriktionsenzym gespalten. Zur 5' Endmarkierung wurden die 5'-Phosphatgruppen nach Angabe des Herstellers mit alkalischer Phosphatase abgespalten und anschließend das Enzym wie bei Maniatis et al. (1982) beschrieben, inaktiviert. Die Markierung wurde nach Maxam und Gilbert (1980) mit T4-Polynukleotidkinase und γ -³²P-ATP durchgeführt. Die Markierung der 3'-Enden von DNS-Fragmenten mit überstehenden 5'-Enden erfolgte durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase in Anwesenheit eines geeigneten α -³²P-dNTP und unmarkierten dNTP's (Maniatis et al., 1982). Durch geeignetes Nachschneiden der markierten Fragmente mit Restriktionsenzymen wurden Fragmente erhalten, die nur an einem Molekülende markiert waren. Diese wurden in low melting Agarosegelen aufgetrennt, wie in Punkt IV.6. beschrieben, '

isoliert und in die basenspezifische Spaltungsreaktionen eingesetzt (Maxam und Gilbert, 1980). Für die (A + G) spezifische Reaktion wurde die Modifizierung von Gray et al. (1978) angewandt. Die erhaltenen Fragmente wurden auf 6, 8 und 20%-igen Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff aufgetrennt und autoradiographiert.

8.2. Didesoxynukleotidmethode nach Sanger (1977)

Die Sequenzierung mittels der Didesoxynukleotidmethode nach Sanger (1977) wurde für das Screening der durch Oligonukleotidmutagenese erhaltenen M13 Phagenklone angewendet. Die Markierung erfolgte mit ^{35}S -dATP. Die erhaltenen Fragmente wurden auf 8 % Polyacrylamidgelen mit 7 M Harnstoff oder auf 6.6 % Gelen mit einem kontinuierlichen Salzgradienten (Schnier, persönliche Mitteilung) aufgetrennt.

8.3. Digitale Verarbeitung der DNS-Sequenzen

Die Speicherung und weitere Verarbeitung der ermittelten Nukleotidsequenzen erfolgte an einem Apple II europlus Mikrocomputer mit Hilfe der Programme Sequence Analysis Version 2.1 und 3.0 von Larson und Messing (1983).

9. Nuklease S1 Kartierung

9.1. Extraktion von RNS

Die Isolierung von Gesamt-RNS aus den Stämmen K116/8 und K116/8 (pWT2) erfolgte über heiße Phenolextraktion nach Aiba et al. (1981).

Ausgehend von 40 ml logarithmisch wachsender Kultur wurden die Zellen mehrmals mit 65°C heißem Phenol, äquilibriert in 50 mM Na-Acetat und 10 mM EDTA, extrahiert. Die Gesamt-RNS wurde aus 0.3 M Na-Acetat pH 7.0 mit Ethanol (absolut) ausgefällt. Nach Umfällen wurden aus 40 ml Kultur etwa 300 mg

Gesamt-RNS erhalten, deren Integrität auf einem 1%-igen Agarosegel kontrolliert wurde.

9.2. Ausbildung von DNS/RNS-Hybriden und Abbau mit Nuklease S1

Die Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des *cysE*-Gens erfolgte nach Berk und Sharp (1977) mit den von Weaver und Weissmann (1979) und Wich et al. (1986) vorgeschlagenen Modifikationen.

Die Hybridisierung wurde in 30 µl 40 mM PIPES pH 6.4, 80 % Formamid, 0.4 M NaCl und 1 mM EDTA durchgeführt. Ca. 50 µg Gesamt-RNS und 0.5 µg des entsprechenden am 5'-Ende markierten DNS-Fragmentes wurden in diesem Gemisch 10 min bei 85°C denaturiert und anschließend für 3 Stunden bei den entsprechenden Hybridisierungstemperaturen inkubiert (siehe Ergebnisteil Punkt III.2.). Das Hybridisierungsgemisch wurde durch Zugabe von 300 µl S1-Puffer (280 mM NaCl, 5 mM Na-Acetat pH 4.6, 4.5 mM ZnSO₄ und 20 µg/ml Träger-DNS (Einzelstrang DNS) verdünnt. Nach Zugabe von Nuklease S1 (1000 U/ml) wurde das Reaktionsgemisch 45 min lang bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl 4 M LiCl und 10 µl 0.5 M EDTA wurde die Reaktion unterbrochen, das Nukleinsäuregemisch mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Die durch RNS vor Nuklease S1 Abbau geschützten DNS-Fragmente wurden auf entsprechenden denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt und autoradiographiert.

10. Hybridisierungsexperimente

10.1. Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten und Oligonukleotiden

"Nick translation" von DNS-Fragmenten wurde nach Maniatis et al. (1982) mit 50 µCi α -³²P-dATP (>3000 Ci/mM) pro µg DNS durchgeführt. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden von dem

markierten DNS-Fragment über eine Sephadex G 50 Minisäule (Pasteurpipette) in TBE abgetrennt.

Die Endmarkierung der Oligonukleotide an der 5'-OH-Gruppe erfolgte nach Maxam und Gilbert (1980) mit T4-Polynukleotidkinase und 100 μCi $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ($>5000\text{ Ci/mm}$). Hier wurden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex G 25 Säule abgetrennt. Der Einbau wurde jeweils über "Cerenkov-Messung" im Flüssigszintillationsspektrometer (Kontron) bestimmt.

10.2. Hybridisierung von DNS-Fragmente

DNS-Fragmente wurden in 0.8%-igen Agarosegelen aufgetrennt, denaturiert und auf Nitrocellulose transferiert (Southern, 1975).

Die gebackenen Filter (1 h, 80°C) wurden 2-4 Stunden in 5 x SSPE (1 x SSPE: 180 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA), 0,7 % Magermilchpulver und 50 % Formamid bei 37°C prähybridisiert (Johnson et al., 1984). Zur eigentlichen Hybridisierung wurden die Filter mit frischem Hybridisierungsmix ($50\text{ }\mu\text{l/cm}^2$), der 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ radioaktiv markierter DNS enthielt, versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Gewaschen wurden die Filter bei Raumtemperatur 2 x 20 min mit 2 x SSPE, 0.7 % Magermilchpulver, 0.1 % SDS und 2 x 20 min mit 0.2 x SSPE, 0.7 % Magermilchpulver, 0.1 % SDS. Die Filter wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und 1-3 Tage exponiert.

10.3. Plaque-Hybridisierung (Dingermann, persönl. Mitteilung)

Einzelstrang DNS (ss-DNS) aus Phagenplages (ca. 200/Platte) wurden durch Auflegen eines Nitrocellulosefilters auf diesen transferiert (Plaque-lifting). Denaturieren der DNS erfolgte durch Einlegen der Filter für 60 sec in 1.5 M NaCl / 0.5 M NaOH und anschließend 5 min in 1.5 M NaCl/ 0.5 M Tris/Cl pH 8.0. Die Filter wurden in 2 x SSPE gespült und 2 Stunden bei 80°C gebacken.

Prähybridisierung wurde für 10 min bei 40°C in 4 x SSC (1 x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM NaCitrat pH 7.5) 0.1 % SDS und 0.7 % Magermilchpulver durchgeführt. Hybridisiert wurde bei gleicher Temperatur 2 Stunden in einem Hybridisierungsmix, dem das radioaktiv markierte Oligonukleotid (0.5 µCi/ml) zugesetzt war. Gewaschen wurde zunächst 3 x 2 min bei Raumtemperatur und anschließend 15 min bei einer Temperatur unterhalb der heterologen Schmelztemperatur (siehe Ergebnisteil V.3.). Die Waschttemperatur wurde dann schrittweise erhöht, wobei die Filter nach jedem Waschschrift zur Überprüfung exponiert wurden.

11. Oligonukleotid gerichtete Mutagenese

Die gezielte Konstruktion von Mutanten mit Hilfe von Oligonukleotiden wurde nach der von Kramer et al. (1984) beschriebenen "gapped-duplex" Methode durchgeführt.

11.1 Präparation eines M13mp9 Derivates

Der zur Abtrennung des Polylinkers verwendete Saccharosegradient wurde durch einmaliges Einfrieren und Auftauen einer 18.5%-igen Saccharoselösung in 100 mM Tris/Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl und 20 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Die beladenen Gradienten wurden 8 h bei 25 000 rpm in einem AH 627 Rotor zentrifugiert. Die bandierte Phagen-DNS wurde mit einer Spritze aufgesaugt, mit Phenol und anschließend mit Äther extrahiert.

Die zueinander komplementären Oligonukleotide mit endständigen HindIII und EcoRI sowie internen BstEII und MluI Restriktionsschnittstellen wurden in einer Konzentration von je 10 µM in Ligationspuffer (Punkt IV.4.) 5 min auf 68°C erhitzt, 15 min auf Raumtemperatur abgekühlt und mit dem über Saccharosegradienten gereinigten Phagen ligiert. Die nach Transfektion von JM101 erhaltenen Phagenklone wurden durch Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein der MluI und BstEII Restriktionsschnittstellen überprüft.

Die Klonierung des zu mutagenisierten DNS-Fragmentes erfolgte nach Standardmethoden.

11.2. Konstruktion der "gapped-duplex" DNS und Transfektion

Ca. 0.1 pMol M13mp19 Doppelstrang-DNS (RF-DNS) wurde mit den Enzymen HindIII und EcoRI vollständig gespalten, mit etwa 0.5 pMol rekombinanter Einzelstrang-DNS (ss-DNS) von M13mp9cys und 5 µl Puffer I (1.5 M KCl, 100 mM Tris/Cl pH 7.5) in einem Endvolumen von 40 µl gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 3 min auf 100°C erhitzt und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Ausbildung der "gapped-duplex" DNS auf einem 1%-igen Agarosegel in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8.0) überprüft. Gapped-duplex DNS und 2 pMol des mutagenen Primer wurden für 5 min auf 65°C erhitzt, auf Raumtemperatur gebracht und mit 4 µl Puffer II (500 mM Tris/Cl, 600 mM Ammoniumacetat, 50 mM MgCl₂, 50 mM Dithiothreitol pH 8.0), 4 µl 2 mM NAD, 4 µl dNTP-Gemisch (je 2.5 mM) und Wasser in einem Endvolumen von 37 µl gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl E.coli DNS-Ligase (2.5 U/µl) und 1 µl T4-DNS-Polymerase (1 U/µl) gestartet und 15 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl des Einzelstrang-DNS bindenden Proteins gp32 (4.4 U/µl) wurde für weitere 90 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0.5 M EDTA pH 8.0 und Erhitzen für 10 min auf 65°C gestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Phenol / Chloroform und Äther extrahiert, mit 60 µl 100 µM CaCl₂ vermischt und sofort zur Transfektion von BMH71-18 mutS verwendet.

Dazu wurden 100 µl DNS-Gemisch und 200 µl kompetente Zellen 90 min auf Eis gestellt, kurz gemischt und 3 min bei 43°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 25 ml LB Medium mit dem gesamten Gemisch inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das durch Zentrifugation gewonnenen Phagenlysat wurde in verschiedenen Verdünnungen (10^{-6} - 10^{-9}) zur Infektion des Stammes MK30-3 verwendet.

C. ERGEBNISSE

I. Isolierung und Charakterisierung Cystein ausscheidender Mutanten von Escherichia coli

Ausgangspunkt für die Entwicklung von mikrobiellen Aminosäureproduzenten war in der Vergangenheit vielfach die Isolierung von Mutanten, deren entsprechende Aminosäurebiosynthese vermindert oder überhaupt nicht mehr durch das Endprodukt kontrolliert wird. Erstes Ziel dieser Arbeit war deshalb die Isolierung von E.coli Mutanten, deren regulatorisches Schlüsselenzym der Cysteinbiosynthese, Serin-Acetyltransferase (SAT; E.C. 2.3.1.30), der Kontrolle durch das Endprodukt L-Cystein nicht mehr bzw. nur mehr eingeschränkt unterliegt. Derartige Regulationsmutanten können prinzipiell isoliert werden (i) durch Selektion auf antimetabolit-haltigen Nährmedien oder (ii) durch Reversion auxotropher Stämme. Da für die Aminosäure L-Cystein bisher kein hoch wirksamer Antimetabolit bekannt ist, wurden die gewünschten Mutanten unter den Revertanten verschiedener cystein-auxotropher Stämme gesucht.

1. Isolierung Ethanmethylsulfonsäure induzierter Revertanten von cystein-auxotrophen Stämmen

Für die Isolierung der Revertanten standen folgende drei cystein-auxotrophe Stämme zur Verfügung: E.coli AC1 und JM39, beide beschrieben als cystein-auxotroph auf Grund einer Mutation im Strukturgen (cysE) der Serin-Acetyltransferase (A. Böck, persönliche Mitteilung; Jones-Mortimer 1968); außerdem E.coli JM240, dessen Cystein-Auxotrophie nicht eindeutig auf eine Läsion des cysE Gens zurückzuführen ist (B. Bachmann, persönliche Mitteilung). Wachstumsversuche mit

verschiedenen Supplementen ergaben keinen definitiven Aufschluß über die mögliche Lokalisation des biochemischen Blocks in diesem Stamm. JM240 wurde dennoch für die Revertantenisolierung herangezogen. Nach Behandlung mit Ethansulfonsäure (EMS) konnten von diesen drei Stämmen eine unterschiedliche Anzahl von Revertanten auf cystein-freiem Minimalmedium isoliert werden. Alle erhaltenen Revertanten wurden zweimal auf cystein-freiem Minimalmedium gereinigt und anschließend auf Cysteinausscheidung getestet.

2. Screening der Revertanten auf Cysteinausscheidung

Zunächst wurden alle 469 erhaltenen Revertanten in einem sogenannten Kreuzfütterungstest auf Cysteinausscheidung getestet. Dazu wurden die zu testenden Revertanten auf ein cystein-freies Minimalmedium, dem der cystein-auxotrophe Indikatorstamm AC1 zugesetzt worden war, ausgebracht. Die Wachstumszone des Indikatorstammes um den jeweiligen Impfstrich (Halo) diente als semiquantitatives Maß für die Cysteinausscheidung der Revertanten.

Alle Revertanten, deren Halo einen Radius $>2\text{mm}$ aufwiesen, wurden als "positiv im Füttertest" bezeichnet und anschließend einem quantitativen Cysteintest unterzogen. Von den 149 getesteten JM240 Revertanten waren 38 % positiv im Füttertest. Dagegen war der Prozentsatz an Cysteinausscheidern unter den Revertanten von AC1 und JM39 mit 6.6 % bzw. 2.5 % relativ gering (Tabelle 4). Für die quantitative Bestimmung von Cystein wurden alle 70 im Kreuzfütterungstest positiven Revertanten in 10 ml flüssigem Standardproduktionsmedium (vergleiche dazu Punkt VII.2.1.) über einen Zeitraum von 48 Stunden inkubiert. Nach Erreichen der stationären Phase wurde den Kulturen in 16-stündigem Abstand zweimal 0.1 ml eines Gemisches aus den Cysteinvorläufern Serin (10 mg/ml), Natriumacetat (100 mg/ml) und Natriumsulfid (50 mg/ml) zugegeben. Jeweils vor Zugabe der "Precursor" und etwa 24 h nach der letzten Zugabe wurde eine Probe entnommen und im zellfreien Kulturüberstand die Cysteinkonzentration

colorimetrisch nach Gaitonde (1967) bestimmt. Tabelle 4 zeigt das Ergebnis. Auch im quantitativen Test lieferten die JM240 Revertanten die deutlich besseren Resultate. Spitzenreiter war mit einer Cysteinkonzentration von 60 mg/l nach 48-stündiger Inkubation die Revertante JM240/33.

Dieser Stamm wurde in einer Reihe nachfolgender Experimente näher charakterisiert und war Grundlage für die weitere Konstruktion eines Cysteinüberproduzenten.

Tabelle 4: Isolierung von Revertanten cystein-auxotropher Stämme

Stamm	Anzahl Revertanten	% pos. im Füttertest	mg Cystein/ml Kulturüberstand
AC1 (argH,cysE)	120	6.6	0-10
JM39 (cysE)	200	2.5	0-8
JM240 (proC,cysE)	149	38	5-60

3. Charakterisierung der Cystein überproduzierenden Mutante JM240/33

Der Frage nach der biochemischen Grundlage für die Cystein-überproduktion der Revertante JM240/33 sollte durch in vitro Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität und ihrer Hemmbarkeit nachgegangen werden. Dazu wurden S30-Extrakte von JM240/33, dem cystein-auxotrophen Elternstamm JM240 sowie dem prototrophen Vergleichsstamm KL16 präpariert. Die Ergebnisse der Enzymtests sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Hemmung der Serin-Acetyltransferase aus Wildtyp KL16 und den Mutanten JM240 und JM240/33 durch L-Cystein

Stamm	Spezifische Aktivität (pkat/mg Protein) ^a		
	ohne L-Cystein	10 μ M L-Cystein	100 μ M L-Cystein
KL16	130	13	-
JM240	270	16	7
JM240/33	250	170	49

a) 1 kat: Umwandlung von 1 Mol Substrat pro Sekunde

Im S30-Extrakt des cystein-auxotrophen Stammes JM240 war SAT Aktivität nachzuweisen, die, bezogen auf den Gehalt an löslichem Protein, fast doppelt so hoch war wie die Aktivität im Rohextrakt des Wildtypstammes KL16. Die Sensitivität der SAT Aktivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein ist im Falle von JM240 und KL16 vergleichbar. Beide Enzyme werden in Anwesenheit von 10 μ M L-Cystein bis auf eine Restaktivität zwischen 5 % und 10 % gehemmt. Dagegen ist die Sensitivität der Serin-Acetyltransferase der Revertante JM240/33 etwa 10-fach reduziert. 10 μ M L-Cystein im Testansatz erlauben noch eine Restaktivität von fast 70 %.

Diese Resultate zeigen, (i) daß die Cysteinauxotrophie des Stammes JM240 mit Sicherheit nicht auf einer Mutation des SAT Strukturgens beruht, und (ii) daß die Cysteinüberproduktion der Revertante JM240/33 höchstwahrscheinlich auf die reduzierte Sensitivität der Serin-Acetyltransferase gegenüber Cystein zurückzuführen ist.

4. Kartierung der zur "Feedbackinsensitivität" führenden Mutation in JM240/33 durch P1 Transduktion

Eine mutative Veränderung der Serin-Acetyltransferase von JM240/33 wurde durch Transfer des SAT Strukturgens auf einen anderen Stamm nachgewiesen. Das SAT Strukturgen *cysE* liegt bei Minute 81 auf dem E.coli Chromosom (Bachmann, 1983). In diesem Bereich sind neben einer Reihe anderer Gene auch die Strukturgene für Mannitolverwertung (*mtlCAD*) sowie für die Orotsäurephosphoribosyltransferase (*pyrE*) lokalisiert. Abbildung 3 zeigt die relative Lage dieser Genorte auf dem Chromosom.

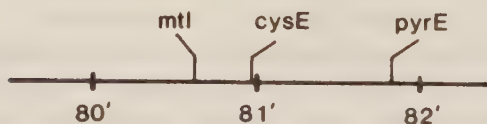


Abbildung 3:

Anordnung der Gene *mtl*, *cysE*, *pyrE* auf dem E.coli Chromosom (nach Bachmann, 1983)

Mit folgendem Transduktionsexperiment wurde die Cotransduktionsfrequenz des Genortes *pyrE* mit dem Genort für Mannitolverwertung und der Eigenschaft der Cysteinausscheidung bestimmt. Auf dem Donorstamm JM240/33 wurde der allgemein transduzierende Phage Plkc vermehrt und mit dem gewonnenen Phagenlysat der Stamm E.coli JF1130 (*mtl*,*pyrE*)

zur Pyrimidinprototrophie transduziert. Von 76 pyrimidin-prototrophen Transduktanten schieden 27 % Cystein aus (positiv im Füttertest) und 12 % waren in der Lage Mannitol als alleinige C-Quelle zu verwerten. Diese Zahlen spiegeln die Anordnung der entsprechenden Gene auf dem Chromosom wieder und bekräftigen die Annahme, daß die Cystein-Überproduktion in JM240/33 mit dem offensichtlich mutierten Strukturgen der Serin-Acetyltransferase, im weiteren mit *cysE*^{*} bezeichnet, gekoppelt ist.

Tabelle 6: Cotransduktionshäufigkeiten der Gene *pyrE*, *mtl* und *cysE*

Donor	Rezipient	selektiver Marker	nicht selektiver Marker	Frequenz
JM240/33	JF1130	<i>pyrE</i> ⁺	<i>cysE</i> [*]	27 %
"	"	"	<i>mtl</i> ⁺	12 %
IF1130	JM39/2	<i>cysE</i> ⁺	<i>mtl</i>	90 %
"	"	"	<i>pyrE</i>	18 %
JM39/2	JF1130	<i>pyrE</i>	<i>mtl</i>	7 %
"	"	"	<i>cysE</i>	6 %

II. Klonierung und Analyse des Serin-Acetyltransferase Strukturgens *cysE** aus der "feedbackinsensitiven" Mutante JM240/33

Die exakte Analyse der genetischen Grundlage für die "Feedbackinsensitivität" der Serin-Acetyltransferase des Stammes JM240/33 erfordert die Kenntnis der Primärstruktur des Enzyms. Aus diesem Grunde wurde das mutierte Strukturgen aus JM240/33 kloniert und seine DNS-Sequenz bestimmt. Weiterhin war es außerordentlich interessant, den Einfluß der Klonierung des "feedbackinsensitiven" Schlüsselenzyms der Cysteinbiosynthese auf einem "multicopy" Plasmidvektor auf die Cysteinproduktion zu untersuchen. Wie aus der Literatur bekannt ist, konnte z.B. durch Klonierung des Threoninoperon aus einer α -Amino- β -hydroxyvaleriansäure-resistenten Mutante die Threoninproduktion in E.coli um 20 % gesteigert werden (Mizukami et al., 1986). Ähnliches wurde auch bei Klonierung anderer Aminosäurebiosynthesogene beobachtet.

1. Konstruktion eines für die Klonierung von *cysE** geeigneten Rezipientenstammes

Die Klonierung des *cysE** Gens sollte über Komplementation eines *cysE* Stammes erfolgen. Für die erfolgreiche Durchführung eines derartigen Klonierungsansatzes sind folgende Eigenschaften des Rezipientenstammes erforderlich:

- (i) Der Stamm muß eine Mutation im *cysE* Gen aufweisen, die zum vollkommenen Ausfall der Serin-Acetyltransferase Aktivität führt.
- (ii) Er muß in der *recA* abhängigen Rekombinationsreparatur defekt sein.
- (iii) Er muß befriedigende Transformationsausbeuten liefern (mindestens 10^4 Klone/ μ g VektorDNS).

Als Ausgangsstamm für die Konstruktion des gewünschten Rezipienten, die schematisch in Abbildung 4 dargestellt ist, wurde E.coli JM39 ausgewählt. Im Enzymtest konnte gezeigt werden, daß dieser cystein-auxotrophe Stamm keine Serin-

Acetyltransferase Aktivität aufweist. Die Korrelation von SAT Defizienz und Läsion im *cysE* Gens sollte durch P1 Transduktionen bestätigt werden. Da JM39 auf Grund einer zusätzlichen Mutation (*tfr-8*) resistent gegenüber P1 Phagen war, mußte zunächst ein P1 sensitives Derivat von JM39 isoliert werden. Durch Verwendung von P1Cmclr Phagen konnte nach der Selektionsmethode von Goldberg et al. (1974) der P1 sensitive Klon JM39/2 isoliert werden.

In zwei von einander unabhängigen, reziproken P1 Transduktionen mit den Stämmen JM39/2 (*cysE*) und JF1130 (*mtl*, *pyrE*) wurde die Cotransduktionsfrequenz der genetischen Marker *cysE*, *mtl*, *pyrE* bestimmt. Wie die in Tabelle 6 zusammengefaßten Cotransduktionsfrequenzen eindeutig zeigen, beruht die Cystein-Auxotrophie des Stammes JM39 auf einer Mutation des *cysE* Gens. In einem weiteren Schritt auf dem Wege zur Konstruktion eines Rezipienten sollte die Fähigkeit zur *recA* abhängigen Rekombinationsreparatur in dem Stamm JM39/2 zerstört werden. Dazu wurde in einem Konjugationsexperiment mit dem Donorstamm JC10240 das Wildtypallel *recA*⁺ gegen das mutierte Allel *recA56* ausgetauscht. Hierbei wurde die auf dem Chromosom zu *recA56* benachbarte Transposoninsertion *srl300::tn10* als selektiver Marker verwendet. Damit bei einer Klonierung des *cysE*^{*}-Gens auch auf Tetracyclin-Resistenz selektiert werden kann, war es notwendig, den rekombinationsdefizienten Stamm JM39/4 von der durch *Tn10* vermittelten Tetracyclin-Resistenz zu kurieren. Mit der von Maloy und Nunn (1981) beschriebenen Methode zur Selektion tetracyclin-sensitive Klone wurde auf fusarsäure-haltigem Medium der tetracyclin-sensitive Klon JM39/5 isoliert. Für den Test auf Transformierbarkeit des Rezipientenstammes JM39/5 wurde das Plasmid pBR322 (Bolivar et al., 1981) verwendet. Die Ausbeute an ampicillin-resistenten Transformanten betrug ca. 10^4 pro µg eingesetzter Vektor-DNS. Diese Frequenz konnte jedoch durch Aufbewahrung der kompetenten Zellen auf Eis über einen längeren Zeitraum (12-24h) auf 10^5 Klone/µg DNS gesteigert werden (Dagert und Ehrlich, 1979).



Abbildung 4:

Konstruktion eines Rezipientenstammes für die Klonierung des cysE-Gens

2. Klonierung des $cysE^*$ -Gens aus JM240/33

Mit je einer der Restriktionsendonukleasen BamHI, EcoRI, PstI und SalI wurde Gesamt-DNS des Stammes JM240/33 abgebaut. Das Vektor-Plasmid pBR322 (Bolivar et al., 1977) wurde ebenfalls mit je einem dieser Enzyme geschnitten und zur Verhinderung einer Religation mit alkalischer Phosphatase behandelt (Ullrich et al., 1977). In vier verschiedenen Ansätzen (1: BamHI; 2: EcoRI; 3: PstI; 4: SalI) wurde die geschnittenen Spender-DNS mit der entsprechend präparierten Vektor-DNS in einem äquimolaren Verhältnis gemischt und über Nacht mit E.coli Ligase ligiert. Kompetente Zellen des Stammes JM39/5 wurden mit den vier verschiedenen Ligationsgemischen in separaten Ansätzen transformiert und nach 30-minütiger phänotypischer Expression der Antibiotikaresistenzen auf cystein-freies, antibiotika-haltiges Minimalmedium ausgespatelt. Transformanten aus den Ansätzen 1 und 2 wurden auf 100 µg/ml Ampicillin, solche aus den Ansätze 3 und 4 auf 10 µg/ml Tetracyclin selektiert. Nur der Klonierungsansatz mit dem Restriktionsenzym BamHI führte nach mehrtägiger Bebrütung zur Isolierung zweier cystein-prototropher, ampicillin-resistenter Klone. Aus beiden Klonen konnte je ein 8.0 kb großes rekombinantes Plasmid isoliert werden. Die mit pCys1 und pCys2 bezeichneten Plasmide trugen je ein 3.7 kb großes chromosomales BamHI-Insert. Für alle weiteren Experimente wurde das Plasmid pCys2 verwendet (Abb. 5). Eine Retransformation dieses Plasmides in JM39/5 führte zu einer 100%-igen Komplementation der Cystein-Auxotrophie. Die Ausgangsklone JM39/5 (pCys1) und JM39/5 (pCys2) wie auch die Retransformanten verursachten im Kreuzfütterungstest ein intensives Wachstum des Indikatorstammes (Halo > 6 mm). Auf Grund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß sich das mutierte Strukturgen ($cysE^*$) der Serin-Acetyltransferase auf dem klonierten 3.7 kb Fragment befindet.

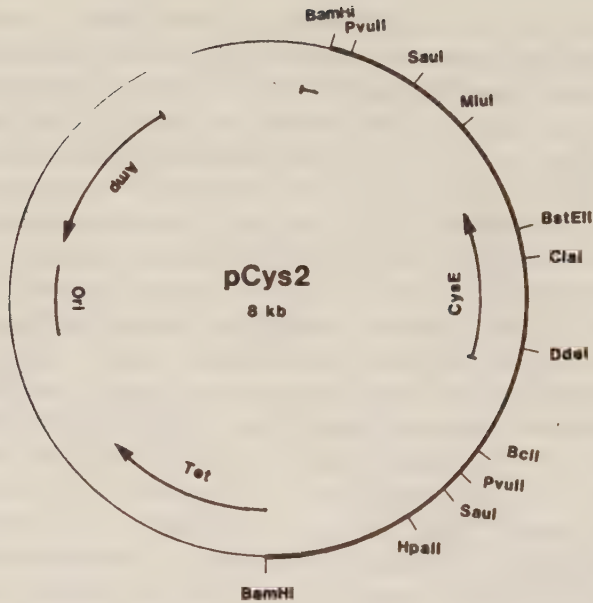


Abbildung 5:

Restriktionskarte des Plasmides pCys2

—— pBR322; ——— chromosomale DNS

3. Hybridisierungsexperimente mit ^{32}P -markiertem BamHI Restriktionsfragment aus pCys2

Ein Hybridisierungsexperiment nach Southern (1975) sollte zeigen, daß dieses klonierte, das cysE^* -Gen tragende 3.7 kb BamHI Restriktionsfragment, in der chromosomalen DNS von JM240/33 existiert.

Dazu wurden die mit BamHI abgebaute chromosomale DNS des Stammes JM240/33 und die BamHI geschnittene DNS des Plasmides pCys2 auf einem 0.8%-igem "low melting" Agarosegel aufge-

trennt, denaturiert und auf Nitrocellulose transferiert. Die "geblotteten" DNS-Fragmente wurde gegen gereinigtes ^{32}P -markiertes BamHI Fragment aus pCys2 hybridisiert. In Abbildung 6, Spur 2, ist gezeigt, daß in dem Gemisch chromosomaler Restriktionsfragmente nur ein Hybridisierungssignal erhalten wird. Dieses befindet sich auf gleicher Höhe mit dem Signal des BamHI Fragmentes aus pCys2 (Abb. 6, Spur 1) und ist so in der Größe mit diesem identisch. Die zusätzlich in Spur 1 auftretenden Hybridisierungssignale resultieren von den linearisierten und ungeschnittenen Formen des Plasmides pCys2.

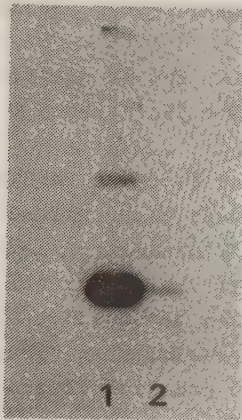


Abbildung 6:

Autoradiogramm der Hybridisierung des mit ^{32}P markierten BamHI-Fragmentes aus pCys2 gegen (1) pCys2, gespalten mit BamHI und (2) chromosomale DNS aus JM240/33, gespalten mit BamHI.

4. Physikalische Kartierung des Plasmides pCys2

Durch Einzel- bzw. Doppelaubbau der Plasmide pCys2 und pBR322 mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen und anschließendem Vergleich der entstandenen Restriktionsschnittmuster wurden die in Abbildung 5 angegebenen Restriktionsschnittstellen ermittelt. Die Spaltung der Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BclI war erst möglich, nachdem die Plasmid-DNS aus einem dam-Methylase defizienten Stamm (E.coli WA321) präpariert worden war.

5. Subklonierung des *cysE*^{*}-Gens

In den drei nachfolgend beschriebenen Subklonierungsexperimenten wurden verschieden große Restriktionsfragmente des BamHI Inserts von pCys2 in pBR322 subkloniert, um Hinweise auf die ungefähre Lage des *cysE*^{*}-Gens innerhalb des 3,7 kb BamHI Fragmentes zu erhalten (Abb. 7). Dazu wurden

- (i) die beiden BamHI/ClaI Restriktionsfragmente (1.45 kb und 2.55 kb) getrennt in den ebenfalls mit BamHI und ClaI geschnittenen Vektor pBR322 kloniert;
- (ii) das BamHI/HpaII Restriktionsfragment (3.0 kb) in den mit BamHI und EcoRV geschnittenen Vektor pBR322 ligiert;
- (iii) das PvuII Restriktionsfragment (2.55 kb) in die singuläre PvuII Restriktionsschnittstelle des Vektors pBR322 inseriert.

Mit den neu rekombinierten Plasmiden pCys3 (enthält BamHI/HpaI Restriktionsfragment), pCys4 (enthält PvuII Restriktionsfragment), pCys5 (enthält 2.55 kb BamHI/ClaI Restriktionsfragment) und pCys6 (enthält 1.45kb BamHI/ClaI Restriktionsfragment) (Abb.7) wurden kompetente Zellen des Stammes JM39/5 transformiert. Die Selektion ampicillin-resistenter Klone erfolgte auf Minimalmedium mit L-Cystein und Ampicillin. Je 50 der erhaltenen Klone eines jeden Klonierungsansatzes wurden auf cystein-freiem, ampicillin-haltigem Minimalmedium auf Komplementation der Cystein-Auxot. wie von JM39/5 getestet. Dabei zeigte sich, daß der Stamm JM39/5 nur in Anwesenheit der Plasmide pCys3 oder pCys4 ohne Cystein wachsen kann. Die Plasmide pCys5 und pCys6 dagegen komplementieren die Cystein-Auxotrophie nicht. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die singuläre ClaI Restriktionsschnittstelle die Expression des putativen *cysE*^{*}-Genes inaktiviert.

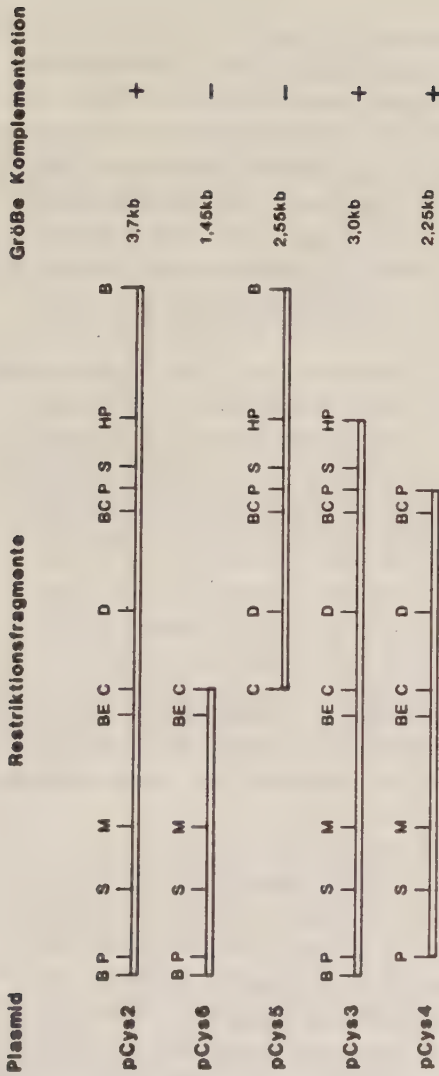


Abbildung 7:

Physikalische Karte der verschiedenen Restriktionsfragmente, die zur Subklonierung des *cysE**-Gens in pBR322 verwendet wurden. Symbole: B (BamHI), BC (BclI), BE (BstEII), C (ClaI); D (DdeI), HP (HpaI), M (MluI), P (PvuII), S (SauI).

6. Sequenzierung des mutierten Strukturgens ($cysE^*$) der Serin-Acetyltransferase

Zur Bestimmung der DNS-Sequenz mittels der chemischen Methode von Maxam und Gilbert (1980) ist nach der in Abbildung 8 gezeigten Sequenzierungsstrategie vorgegangen worden. Von den angegebenen Restriktionschnittstellen aus wurde die Sequenz beider DNS-Stränge bestimmt. Zur Sequenzierung von der BclI Schnittstelle aus war eine vorherige Transformation des Plasmides pCys2 in den dam-Methylase negativen Stamm WA321 (dam-4) notwendig. Alle anderen Sequenzanalysen wurden an dem Plasmid pCys2, das aus dem Stamm HB101 präpariert wurde, durchgeführt.

Ein durchgehender offener Leserahmen mit einer kodierenden Region von 819 Basenpaaren wurde gefunden. Der Leserahmen kann für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 29.2 kDa kodieren. Eine mögliche Ribosomenbindestelle der Sequenz 5' GGAG 3' liegt 6 Basenpaare stromaufwärts von dem als Initiationscodon postulierten ATG (Abb. 11) (Shine und Dalgarno, 1974).

7. Expression des $cysE^*$ -Gens in Minizellen

In einem Minizellexperiment wurde untersucht, ob der durch Sequenzanalyse bestimmte offene Leserahmen von 819 Basenpaare tatsächlich exprimiert, und ein Protein von entsprechendem Molekulargewicht synthetisiert wird.

Dazu wurden die Plasmide pCys2 und pBR322 in den Minizellen produzierenden Stamm E.coli DS410 transformiert. Die Minizellen wurden isoliert, radioaktiv markiert und die plasmidkodierte Proteine auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis:

Minizellen, die das Plasmid pBR322 enthalten, synthetisieren vornehmlich β -Lactamase (Vorläufer, reifes Protein und Abbauprodukt) (Abb. 9, Spur 1). pCys2 enthaltene Minizellen

zeigen eine deutlich geringere Inkorporation von ^{35}S -Methionin in β -Lactamase Protein, möglicherweise auf Grund

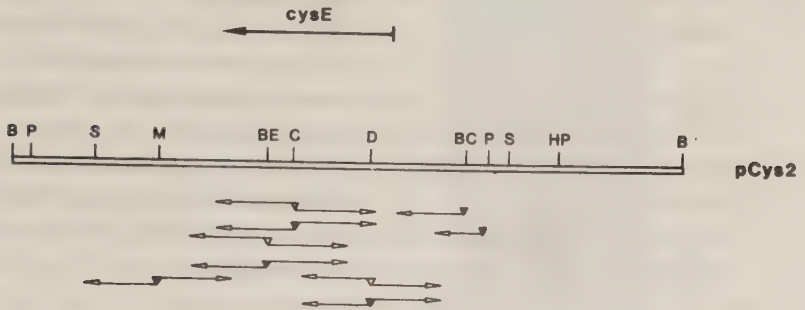


Abbildung 8:

Restriktionskarte des BamHI-Fragmentes aus pCys2 mit Sequenzierstrategie. Pfeile unterhalb des DNS-Fragmentes geben Umfang und Ausgangspunkt einer jeden Sequenzanalyse an; 3' markierte Fragmentenden sind durch offene, 5' markierte durch ausgefüllte Dreiecke gekennzeichnet. Der Pfeil oberhalb des DNS-Fragmentes kennzeichnet den 819 bp offenen Leserahmen des *cysE*-Gens. Symbole: B (BamHI), BC (BclI), BE (BstEII), C (ClaI), D (DdeI), HP (HpaI), M (MluI), P (PvuII), S (SauI).

einer geringeren Kopienzahl von pCys2 verglichen mit pBR322 (Abb. 9 Spur 2). Es konnte jedoch eine zusätzliche Proteinbande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 34 kDa nachgewiesen werden. Berücksichtigt man die Tatsache, daß Molekulargewichte von Proteinen, die über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmt werden generell etwas höher liegen können als die von DNS-Sequenzen abgeleiteten Molekulargewichte, so könnte es sich bei der 34 kDa Proteinbande um das *cysE** Genprodukt handeln.

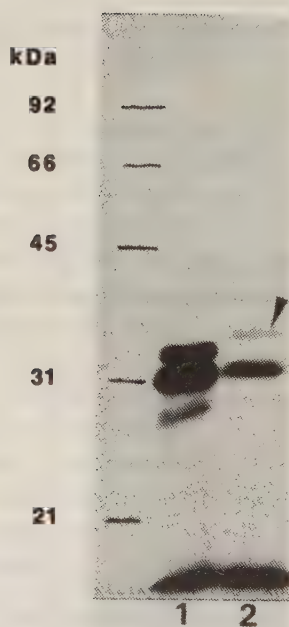


Abbildung 9:

Autoradiogramm der ^{35}S markierten und elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von Minizellen, die das Plasmid (1) pBR322 und (2) pCys2 enthalten. Der Pfeil kennzeichnet das präsumptive cysE Genprodukt.

III Klonierung und Analyse des Serin-Acetyltransferase Strukturgens cysE⁺ aus dem Wildtypstamm E.coli KL16

Die Klonierung des Wildtypallels des Serin-Acetyltransferase Strukturgens wurde aus folgenden Gründen durchgeführt:

- (i) Die DNS-Sequenz des Wildtypgens sollte ermittelt werden, damit durch einen Vergleich mit der Sequenz des mutierten Gens die zur "Feedbackinsensitivität" führende Mutation identifiziert werden kann.
- (ii) Es sollten Informationen über Expressionssignale des Wildtypgens erhalten werden.

1. Klonierung und Sequenzierung des cysE^+ -Gens aus *E.coli* KL16

Für die Klonierung des Wildtypgens wurde chromosomale DNS aus dem Stamm *E.coli* KL16 verwendet; das Vorgehen war identisch mit der vorstehend beschriebenen Klonierung des cysE^* -Gens.

Auf ampicillin-haltigem Minimalmedium ohne L-Cystein konnten vier cystein-prototrophe Klone isoliert werden. Präparation der Plasmid-DNS aus einem der Klone führte zu einem 8.0 kb großen rekombinanten Plasmid, das mit pWT2 bezeichnet wurde. Auch dieses Plasmid trug ein chromosomales BamHI-Insert von 3.7 kb. Restriktionsanalyse dieses Plasmides ergab dieselbe Anordnung der Restriktionsenzymchnittstellen wie sie für das Plasmid pCys2 bestimmt worden war.

Die Sequenzierung des cysE^+ -Gens erfolgte ausgehend von der ClaI und der DdeI Restriktionsschnittstelle doppelsträngig in beide Richtungen (siehe Abbildung 8). Das Auffinden des 819 Basenpaare offenen Leserahmens geschah durch Computeranalyse.

2. DNS-Sequenzvergleich der Gene cysE^* und cysE^+ und Identifizierung der zur "Feedbackinsensitivität" der Serin-Acetyltransferase führenden Mutation.

Die Nukleotidsequenz von Wildtyp- und Mutantenallel des cysE -Strukturgens sowie der nicht codierenden Bereiche bis 220 Basen stromaufwärts des Initiationscodons ATG und 100 Basen stromabwärts des Stopcodons TAA wurden miteinander verglichen. Das Ergebnis war eine vollkommene Übereinstimmung der Basensequenz bis auf einen einzigen Basenaustausch an Position 767 des 819 Basenpaare umfassenden offenen Leserahmenens. Wie Abbildung 11 zeigt, führt die Transition von Guanodin (Wildtyp) zu Adenosin (Mutante) zu einem putativen Aminosäureaustausch von Methionin gegen Isoleucin. Der Zusammenhang zwischen dem Basenaustausch und der Desensi-

Molecular weight of this protein is 29260.8

Abbildung 10:

Nukleotidsequenz (nicht kodierender Strang) des Wildtyp *cysE*-Gens und flankierender Regionen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist oberhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die EMS induzierte Mutation sowie der resultierende Aminosäureaustausch sind eingrahmt. Der Transkriptionsstartpunkt ist mit +1 gekennzeichnet. 2 putative Transkriptionssignale (-10 und -35 Region) sowie eine mögliche Ribosomenbindestelle (SD) sind unterstrichen.

bilisierung der Serin-Acetyltransferase gegenüber dem Inhibitor L-Cystein konnte durch das in Abbildung 11a dargestellte Austauschexperiment gezeigt werden:

Ein MluI/BstEII Restriktionsfragment, das die mutierte Basensequenz beinhaltet, wurde von Plasmid pCys2 isoliert und durch das entsprechende Fragment aus dem Plasmid pWT2 ersetzt und umgekehrt. Mit den neu rekombinierten Plasmiden pCys2' und pWT2' wurde der Stamm JM39/5 zur Prototrophie transformiert. Im Kreuzfütterungstest wurden die vier plasmidhaltigen Klone JM39/5 (pCys2), JM39/5 (pWT2), JM39/5 (pCys2') und JM39/5 (pWT2') hinsichtlich Cysteinausscheidung miteinander verglichen. Abbildung 11b zeigt das Ergebnis: Im Falle von JM39/5 (pCys2) und JM39/5 (pCys2') deutet das intensive Wachstum des Indikatorstammes (Halo > 6 mm) auf eine starke Cysteinausscheidung hin. Die Klone JM39/5 (pWT2) und JM39/5 (pWT2') zeigen dagegen nur sehr schwache Füttereffekte. Durch Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität und deren Hemmbarkeit durch L-Cystein in den S30-Extrakten dieser vier Klone konnten die Ergebnisse des Kreuzfütterungstestes bestätigt werden. So wurde die SAT Aktivität von JM39/5 (pWT2') durch 10 μ M L-Cystein zum gleichen Ausmaß (bis 80%) gehemmt, wie die des Klones JM39/5 (pWT2). Die SAT Aktivität der Stämme JM39/5 (pCys2) und JM39/5 (pCys2') wiesen dagegen eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein, wie sie für das Enzym aus JM240/33 charakteristisch ist, auf.

Die zur Kontrolle ausgeführte Sequenzierung der ausgetauschten Bereiche in den Plasmiden pCys2 und pCys2' bestätigte den Basenaustausch an Position 767.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß die Veränderung der Primärstruktur der Serin-Acetyltransferase durch einen einzigen Aminosäureaustausch an Position 256 die Desensibilisierung des Enzyms gegenüber dem Inhibitor L-Cystein zur Folge hat; dies wiederum führt zur Überproduktion und Ausscheidung der Aminosäure L-Cystein.

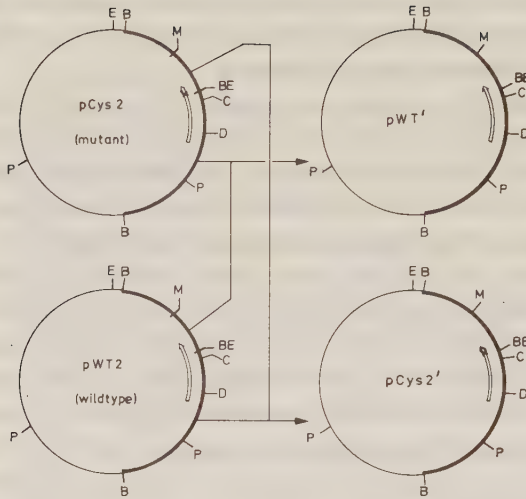
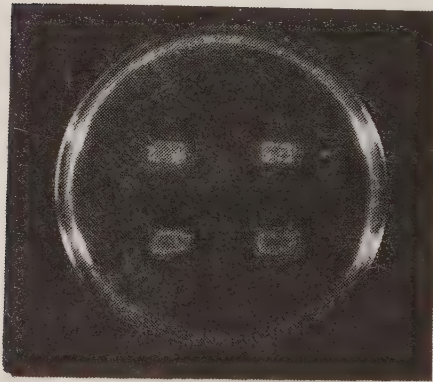
A**B**

Abbildung 11:

- a) Austausch des 0.6 kb MluI/BstEII Restriktionsfragmentes der Plasmide pCys2 und pWT2. Das Kreuz kennzeichnet die mutierte Basensequenz. — pBR322 — chromosomale DNS
 ⇒ Wildtyp cysE-Gen ⇏ mutiertes cysE-Gen
- b) Kreuzfütterungstest der Stämme (1) JM39/5 (pCys2), (2) JM39/5 (pWT2), (3) JM39/5 (pCys2'), (4) JM39/5 (pWT2')

3. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *cysE*⁺-Gens mit Nuclease S1.

Aus der Position des Transkriptionsstartpunktes der m-RNS können Informationen über Lage und Ausgestaltung von Expressions- und etwaigen Regulationsignalen eines Gens erhalten werden.

Ergebnisse einer Reihe physiologischer und enzymatischer Untersuchungen zeigten, daß die Expression des Serin-Acetyltransferase Strukturgens (*cysE*) unabhängig von der Kontrolle des *cysB*-Genproduktes, einem positiven Regulatorprotein, ist (Jones-Mortimer, 1968; Kredich 1971). Um Informationen über den für eine konstitutive Expression des *cysE*-Gens verantwortlichen DNS-Abschnitt zu erhalten, wurde der Transkriptionsstartpunkt dieses Gens kartiert.

Dazu wurde das Plasmid pWT2 mit den Restriktionsendonucleasen BstEII und SauI geschnitten und ein 1.3 kb großes Restriktionsfragment isoliert. Dieses umfaßt den N-terminalen Teil des Strukturgens sowie den Bereich ca. 650 Basenpaare stromaufwärts vom Initiationscodon (siehe Abbildungen 8 und 12a). Dieses Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym DdeI geschnitten und die entstandenen Restriktionsfragmente wurden mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markiert. Anschließend wurden sie mit dem Enzym PvuII nachgeschnitten und über ein 0.8%-iges "low melting" Agarosegel aufgetrennt. Ein 0.65 kb DdeI/PvuII Restriktionsfragment, welches nur im kodierenden DNS-Strang markiert war, wurde aus dem Gel eluiert, mit Gesamt-RNS aus *E. coli* KL16 (pWT2) vermischt und bei 85°C denaturiert. Zur Ausbildung von RNS/DNS-Hybriden wurde das denaturierte Nukleinsäuregemisch auf vier parallele Ansätze verteilt und 3 Stunden bei 53°C, 55°C, 57°C oder 59°C respektive inkubiert. Für den DNS-Abschnitt etwa 200 Basenpaare stromaufwärts und 135 Basenpaare stromabwärts von Initiationscodon wurde nach der Formel

$$T_M = 81.5 + 0.5(\%G+C) + 16.6\log(\text{Na}^+) - 0.6(\%\text{Formamid})$$

(Casey und Davidson, 1977) eine Schmelztemperatur von 52.9°C errechnet. In Anwesenheit hoher Formamidkonzentrationen

(80-90%), wie sie hier verwendet wurden, liegt die Schmelztemperatur von RNS/DNS-Hybriden 5-10 % über der entsprechenden DNS/DNS-Hybride (Casey und Davidson, 1977). Somit sollte der relevante Temperaturbereich abgedeckt sein. Im Anschluß an die Hybridisierung erfolgte die Behandlung mit Nuclease S1. Die durch RNS vor Nuclease S1 Abbau geschützten Fragmente wurden auf einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und autoradiographiert.

A

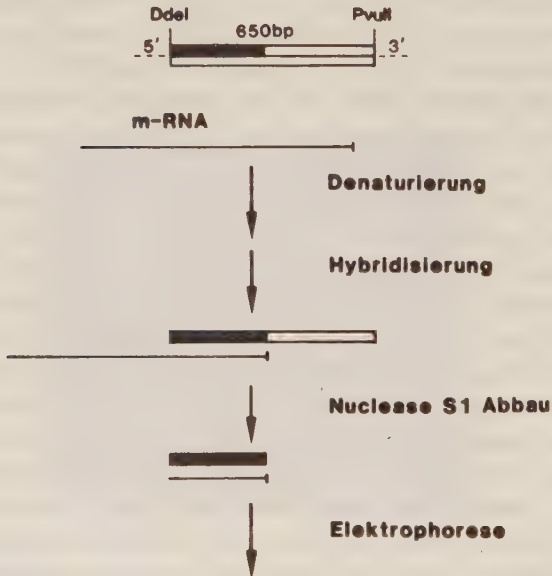


Abbildung 12:

a) Schematische Darstellung des Nuclease S1-Versuches

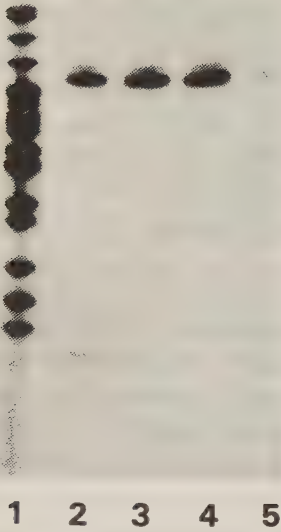
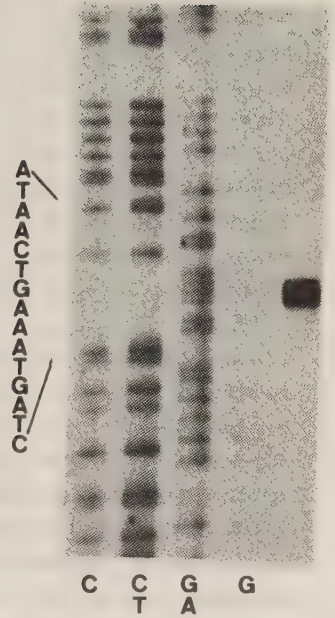
B**C**

Abbildung 12: (Forts.)

- b) Autoradiogramm der bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen durch RNS vor Nuklease S1 Abbau geschützten und in denaturierendem Polyacrylamidgel aufgetrennten DNS-Fragmente. (1) Molekulargewichtsstandard (pBR322 gespalten mit HpaII), (2) 53°C, (3) 55°C, (4) 57°C, (5) 59°C
- c) Parallele Elektrophorese des geschützten DNS-Fragmentes mit der Sequenzleiter des DdeI/PvuII Restriktionsfragmentes.

Abbildung 12b Spur 2 - 5 zeigt die Abhängigkeit von der Hybridisierungstemperatur.

Mit steigender Temperatur verschwinden unspezifische Banden, wogegen ein intensives Signal über den gesamten Temperaturbereich erhalten bleibt. Durch Vergleich mit einem radioaktiv markierten Längenstandard (pBR322 geschnitten mit HpaII) ergibt sich für dieses durch RNS vor Nuklease S1 Abbau geschützte DNS-Fragment eine ungefähre Größe von 260 bp. Durch Elektrophorese, Seite an Seite mit der Sequenzleiter des DdeI/PvuII Restriktionsfragmentes, wurde der Transkriptionsstartpunkt des $cysE^+$ -Gens nach Korrektur von 1.5 Nukleotiden am 5'-Ende (Hentschel et al., 1980) 118 Basenpaare stromaufwärts vom Initiationscodon ATG bestimmt (Abbildung 12c und 10).

Dieses Ergebnis sollte durch einem weiteren S1 Versuch bestätigt werden. Anstelle der internen DdeI Restriktionsschnittstelle wurde diesmal die weiter stromabwärts liegende ClaI Restriktionsschnittstelle radioaktiv markiert. Nach Hybridisierung mit Gesamt-RNS aus KL16 (pWT2) und Nuklease S1 Abbau konnte auf einem denaturierenden Gel ein vor S1 Abbau geschütztes Fragment der erwarteten Größe von ca. 650 bp nachgewiesen werden. In einem weiteren Kontrollversuch sollte gezeigt werden, daß es sich bei dem ursprünglich erhaltenen S1 Signal nicht um ein plasmidbedingtes Artefakt handelt. Dazu wurde das markierte DdeI/PvuII Restriktionsfragment diesmal mit Gesamt-RNS aus dem plasmidfreien Stamm KL16 hybridisiert. Auch hier wurde das vor S1 Abbau geschützte Fragment von ca. 260 bp nachgewiesen. Das Signal war erwartungsgemäß deutlich schwächer als bei Verwendung von Gesamt-RNS aus dem plasmidhaltigen Stamm KL16 (pWT2).

IV. Versuche zum gezielten Austausch von Methionin (256) in der Aminosäurekette der Serin-Acetyltransferase gegen Lysin, Glutaminsäure, Cystein und Methionin

Die 1982 publizierte Methode der Oligonukleotid gerichteten Mutagenese (Miyada et al., 1982; Zoller und Smith, 1982) eröffnete die Möglichkeit einzelne Aminosäurereste eines Proteins gezielt zu verändern. Dadurch war es möglich, die Struktur-Funktions-Beziehung vieler Proteine wie z.B. der Tyrosyl-tRNA Synthetase (Beduelle und Winter, 1986), der Dihydrofolatreduktase und der Aspartat-Transcarbamoylase (Robey et al., 1986) genauer zu studieren. Die durchgeführten Modifikationen sind von großem Wert für die Identifizierung der aktiven Zentren von Enzymen, die detaillierte Aufklärung von Enzym-Substrat-Interaktionen und das Erkennen der Katalysemechanismen. Auch Veränderungen der Substrataffinität (K_M) (Wilkinson et al., 1984), der regulatorischen Eigenschaften (Robey et al., 1986) sowie des pH- und Temperatur-optimums von Enzymen (Thomas et al., 1985) konnten erzielt werden. Die Lokalisation und Art des gezielten Austausches orientierte sich in vielen der oben genannten Beispiele an Röntgenstrukturdaten sowie an der Konservativität bestimmter Aminosäurereste des Proteins.

Die auch als "site directed mutagenesis" bekannte Methode ist in den letzten Jahren in diversen Einzelheiten verbessert und verfeinert worden. Das Prinzip der gezielte Mutagenese beruht auf der Hybridisierung eines synthetischen Oligonukleotides mit einer Länge von normalerweise 15-20 Basenpaaren an die zu mutagenisierende, in M13 Phagen klonierte einzelsträngige DNS. Die Sequenz des Oligonukleotides ist bis auf die gewünschten Basenaustausche der Zielsequenz komplementär. Im nächsten Schritt werden die verbleibenden Einzelstrangbereiche mit DNS-Polymerase aufgefüllt und mittels Ligase verknüpft (Abb. 13). Vorteil der hierfür entwickelten "double priming" und "gapped-duplex" Methoden (Zoller und Smith,

1984; Kramer et al. 1982) gegenüber der ursprünglich angewandten "single priming" Technik ist die wesentlich höhere Ausbeute an doppelsträngiger Phagen-DNS. Transformation dieser Phagen DNS und Vermehrung ohne Selektionsdruck für den gewünschten Marker, d.h. die gewünschte Mutation, führt zu Ausbeuten zwischen 1 und 10 %. Es wurden Selektionsmethoden entwickelt, die im Prinzip alle auf der Kopplung des synthetischen Markers mit einem auf der Phagen-DNS befindlichen indirekt selektiven Marker beruhen. Damit können Ausbeuten bis zu 100 % erzielt werden (Kunkel, 1985; Winter, et al., 1985; Kramer, et al. 1984).

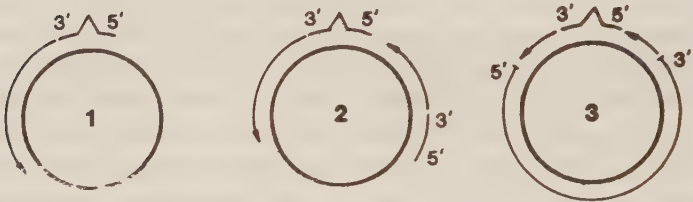


Abbildung 13:

Methoden der Oligonukleotidmutagenese:

1: "single priming"; 2: "double priming"; 3: "gapped-douplex"

— M13 ss-DNS; — mutagener primer; — Primer

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt, führt ein einziger, durch EMS-Mutagenese induzierter Austausch der Aminosäure Methionin (256) gegen Isoleucin zu einer 10-fachen Verringerung der Sensibilität der Serin-Acetyltransferase gegenüber dem Inhibitor L-Cystein. Dieses Ergebnis legt nahe, daß die Aminosäureposition 256 an der Gestaltung der

Inhibitorbindestelle beteiligt ist. Eine Permutation dieser Position könnte somit weitere Mutantenenzyme mit veränderten regulatorischen Eigenschaften hervorbringen.

Nun lagen für die SAT aus E.coli weder Röntgenstrukturdaten noch Sequenzvergleiche mit Serin-Acetyltransferasen anderer Organismen vor, so daß für die Wahl der substituierenden Aminosäuren keine Anhaltspunkte gegeben waren. Da es sich bei dem durch EMS induzierten Austausch Methionin gegen Isoleucin um einen sehr moderaten handelt (beide Aminosäuren besitzen unpolare Seitenketten mit ähnlicher Struktur), hatten unsere Arbeiten zunächst zum Ziel an Position 256 Aminosäuren einzusetzen, die sich sowohl in Ladung wie in Struktur vom Methionin und auch teilweise untereinander stark unterscheiden. Aus der Gruppe der Aminosäuren mit geladenen Seitenketten wurde deswegen Glutaminsäure und Lysin, aus der Gruppe der Aminosäuren mit ungeladenen, polaren Seitengruppen wurde Threonin und Cystein ausgewählt.

Die gezielte Mutagenese der Aminosäureposition 256 der Serin-Acetyltransferase wurde nach der von von Kramer et al. (1984) entwickelte "gapped-duplex" Methode durchgeführt. Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

1. Konstruktion eines M13mp9 Derivates und Klonierung des MluI/BstEII Restriktionsfragmentes.

Voraussetzung für die gezielte Mutagenese der Aminosäureposition Methionin (256) war die Klonierung des MluI/BstEII Restriktionsfragmentes, das die zu mutagenisierende Zielsequenz beinhaltet (siehe Abb. 11a), in den Einzelstrangphagen M13mp9.

Dieser trägt, wie auch die Phagen M13mp8 und M13mp10, in zwei für die Phagenpropagierung notwendigen Genen amber Codons und kann deshalb nur auf amber Supressorstämmen vermehrt werden (Messing et al. 1981). Diese Eigenschaft ist entscheidend für die spätere Selektion der gewünschten Mutation. Der Phage M13mp9 besitzt nicht die für eine Klonierung des MluI/BstEII

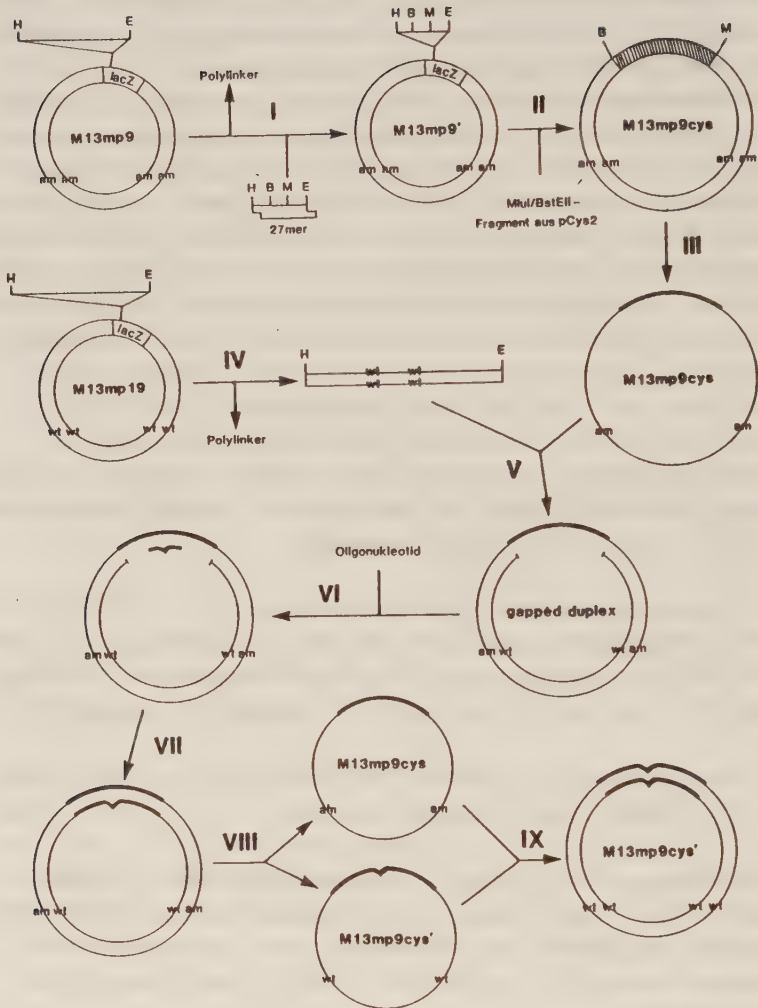


Abbildung 14:

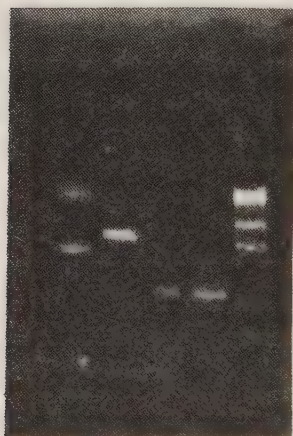
Schematische Darstellung der gezielten Mutagenese des MluI/BstEII Restriktionsfragmentes aus pCys2 mit Hilfe von Oligonukleotiden nach der "gapped-duplex" Methode (Kramer et al., 1984).

Fragmentes notwendigen Restriktionsschnittstellen. Die Phagen-DNS wurde deshalb mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI geschnitten und über einen Saccharosegradienten vom Polylinker abgetrennt. Ein doppelsträngiges, synthetisches Oligonukleotid (27mer) mit randständigen Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI und internen Schnittstellen für die Endonukleasen MluI und BstEII wurde mit der linearisierten Phagen-DNA ligiert (siehe Abbildung 14/I). Die Anordnung der Restriktionsschnittstellen in dem Oligonukleotid war so gewählt, daß durch Klonierung des MluI/BstEII Fragmentes der kodierende DNS-Strang in den +Strang des Phagens inseriert wird. Entscheidend für den Erfolg der Mutagenese ist dann, daß die für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide in ihrer Sequenz, bis auf die gewünschten Basenaustausche, mit dem nicht kodierenden, d.h. m-RNS gleichen Strang identisch sind (vgl. Punkt V.2.). Die neu rekombinierte Phagen-DNS wurde in den Stamm JM101 transformiert. Aus 10 auf X-Gal Platten blauen Phagenplaques (die Sequenz des 27mer war so gewählt, daß der Leserahmen des LacZ Genes erhalten blieb) wurde doppelsträngige Phagen-DNS isoliert und durch Restriktionsanalyse auf das Vorhandensein der Restriktionsschnittstellen für die Enzyme MluI und BstEII getestet. Die MluI/BstEII geschnittene DNS des Phagen M13mp9' wurde dann mit dem 0.6 kb MluI/BstEII Restriktionsfragment aus dem Plasmid pCys2 ligiert und in den Stamm JM109 transformiert (Abb. 14/II). Zur Vermeidung etwaiger Rekombinationsereignisse zwischen der chromosomalen DNS und dem klonierten Fragment wurde der rekombinationsdefekte Stamm JM109 verwendet. Die doppelsträngige Phagen-DNS (RF-DNS) von 12 untersuchten weißen Phagenplaques enthielt das 0.6 kb große MluI/BstEII Restriktionsfragment.

2. Oligonukleotidmutagenese

Neben der einzelsträngigen rekombinanten Phagen-DNS M13mp9cys und den für die Mutagenese verwendeten synthetischen Oligonukleotiden war zur Durchführung der Mutagenese die doppel-

strängige DNS (RF-DNS) des Phagen M13mp19 notwendig. Dieser Phage trägt keine amber Codons und kann somit auch auf nicht amber Suppressorstämmen vermehrt werden. Die RF-DNS von M13mp19 wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI vollständig geschnitten (Abb. 14/IV) und in einem starken Unterschub mit der einzelsträngigen, rekombinanten Phagen-DNS hybridisiert (Abb. 14/V). Die Ausbildung der "gapped-duplex" DNS (gd-DNS) wurde auf einem Agarosegel kontrolliert (Abb. 15).



1 2 3 4 5

Abbildung 15:

Gelelektrophoretische Analyse der Konstruktion von "gapped duplex" (gd) DNS.

(1) M13mp19 RF-DNS; (2) M13mp19 RF-DNS gespalten mit HindIII und EcoRI; (3) M13mp9cys ss-DNS; (4) gapped-duplex Ansatz nach De- und Renaturierung; (5) λ -DNS gespalten mit HindIII

Der gesamte gd-DNS Ansatz wurde geviertelt und in getrennten Ansätzen mit je einem der vier "kinasierten" synthetischen Oligonukleotide hybridisiert (Abb. 14/VI). Abbildung 16 zeigt die Länge der verwendeten Oligonukleotide, deren Sequenzen mit der des m-RNS gleichen Stranges bis auf die gewünschten Basenaustausche identisch waren (vgl. vorangegangenes Kapitel V.1.). Die Länge der Oligonukleotide wurde, wenn möglich, so gewählt, daß die flankierenden 3' und 5' Bereiche G+C reich sind.

896
 Val Val Leu Gln Pro Val Pro Pro His Thr Thr Ala Ala Gly Val Pro Ala Arg Ile Val
 GTG GTG CTG CAA CCG GTG CCG CCG CAT ACC ACC GCC GCT GGC GTT CCG GCT CGT ATT GTC

956
 Gly Lys Pro Asp Ser Asp Lys Pro Ser Met Asp Met Asp Gln His Phe Asn Gly Ile Asn
 GGT AAA CCA GAC AGC GAT AAG CCA TCA ATG GAT ATG GAC CAG CAT TTC AAC GGT ATT AAC

1016
 His Thr Phe Glu Tyr Gly Asp Gly Ile ### TGTCTGTGATCGTCCGGATGCGATGTAATCATCTATC
 CAT ACA TTT GAG TAT GGG GAT GGG ATC TAA

1085
 CGGCCTACAGTAACTAATCTCTCAATACCGCTCCCGGATACCCCAACTGTGCG

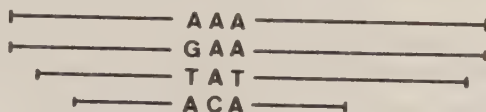


Abbildung 16:

Ausschnitt aus dem C-terminalen Bereich der Nukleotidsequenz des *cysE*-Gens. Unterhalb der Sequenz sind Lage und Ausdehnung der vier für die Mutagenese verwendeten Oligonukleotide, sowie die spezifischen Basenaustausch im Codon 256 gezeigt.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die verbleibenden Einzelstrangbereiche mit T_4 -DNS-Polymerase in Anwesenheit des Einzelstrang bindenden Proteins gp32 aufgefüllt und mit *E. coli* Ligase kovalent verknüpft. Mit den vier verschiedenen Mutageneseansätze A: Oligo AAA (Lys), B: Oligo TAT (Cys), C: Oligo GAA (Glu) und D: Oligo ACA wurde der Mutatorstamm BMH71-18mutS transformiert. In diesem Stamm ist die Vermehrung der Phagen gewährleistet, ohne daß die vorhandenen Fehlpaarungen repariert werden. Es findet jedoch noch keine Selektion statt, so daß die Phagennachkommenschaft gemischt ist (Abb. 14/VIII). Mit den gewonnenen Phagenlysaten wurde

der nicht amber Supressorstamm MK30-3 infiziert. Dabei erfolgt eine starke Selektion gegen den die amber Codons tragenden Phagenstrang. Wie Abbildung 14 zeigt, trägt dieser auch die ursprüngliche Sequenz des MluI/BstEII Fragmentes. Die zur Infektion von E.coli MK30-3 verwendeten Phagenlysate wiesen einen Titer zwischen 10^{10} und 10^{11} pfu/ml auf. Die erhaltenen Phagenklone mußten jetzt auf das Vorhandensein der gewünschten Mutation getestet werden.

3. "Screening" der Phagenklone auf die gewünschte Mutation

Mit der angewendeten Methode können im günstigsten Fall Markerausbeuten bis zu 100 % erhalten werden. Dies hängt im wesentlichen von folgenden Faktoren ab:

- (i) Der Größe des Einzelstrangbereiches (gap);
- (ii) der Länge und Sequenz der Oligonukleotide vor allem im 5'- und 3'- terminalen Bereich;
- (iii) der Anzahl der Fehlpaarungen.

Auf Grund der hohen Ausbeuten die, vor allem nach Auffüllen der Einzelstrangbereiche, erzielt werden, ist ein direktes Screening einiger weniger Phagenklone auf das Vorhandensein des gewünschten Markers durch DNS-Sequenzierung möglich. Es wurden von jedem der Mutageneseansätze A, B, C und D neun Phagenklone zufällig ausgewählt und davon Einzelstrang-DNS präpariert. Zur Vereinfachung wurde zunächst nicht die gesamte Sequenz sondern nur die Abfolge der Thymidinreste dieser DNS bestimmt ("T-tracking" nach Sanger). Wie Abbildung 16 zeigt, wird durch jedes der verwendeten Oligonukleotide der Thymidinrest des codons 256 durch eine andere Base ersetzt, sodaß durch "T-tracking" jede der gewünschten Mutanten zu identifizieren sein müßte. In Abbildung 17 ist das Bandenmuster der T-Spuren von 9 Klonen aus dem Mutageneseansatz A im Vergleich zu dem Muster des Ausgangsklones zu sehen. Unter diesen 9 Klonen des Ansatzes A befanden sich nur zwei, die den besagten Thymidinrest nicht mehr aufwiesen (siehe Abbildung 17, Pfeil), wogegen es bei allen getesteten Klonen des Ansatzes C ersetzt worden war. Von den Klonen A-4, A-7,

C-2, und C-9 wurden die restliche 3 Sequenzreaktionen nach Sanger ausgeführt, um die gesamte Sequenz des mutierten Bereiches zu erhalten. Die Klone A-4 und A-7 wiesen an Aminosäureposition 256 das Codon AAA für die Aminosäure Lysin, die Klone C-2 und C-7 das Codon GAA für die Aminosäure Glutaminsäure auf.

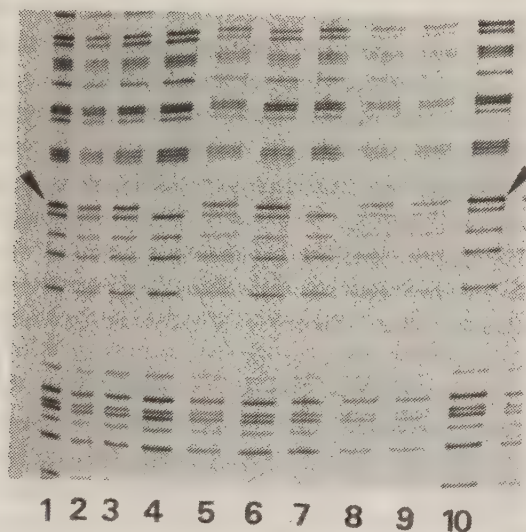


Abbildung 17:

Autoradiogramm des T-Screenings nach Sanger von 9 Klonen des Mutageneseansatzes A (1) - (9) im Vergleich zum Wildtyp (10). Der Pfeil kennzeichnet die Position des Thymidinrestes im Codon 256

Im Falle der Mutageneseansätze C und D konnten mit dem angewendeten T-Screening die gewünschten Mutanten nicht gefunden werden, sodaß anschließend ein sogenanntes Plaque-Screening durchgeführt wurde. Diese Methode erlaubt es eine

größere Anzahl von Phagenklonen gleichzeitig auf das Vorhandensein des synthetischen Markers zu testen.

Dazu werden die entsprechenden, radioaktiv markierten Oligonukleotide zunächst an die filtergebundene, einzelsträngige DNS der zu testenden Klone hybridisiert. Durch schrittweise Erhöhung der Waschtemperatur muß dann eine Bedingung gefunden werden, welche nur mehr die spezifische Hybridisierung des Oligonukleotides an die mutagenisierte und damit homologe Sequenz und nicht mehr an die heterologe Sequenz der nicht mutierten Klone erlaubt. Einen Anhaltspunkt für die Wahl der Temperaturen gibt die Berechnung der homologen Schmelztemperatur nach der Wallace-Regel:

$$(G+C) \times 4^{\circ}\text{C} + (A+T) \times 2^{\circ}\text{C} = T_M(\text{homolog})$$

Für die Berechnung der heterologen Schmelztemperatur werden für jede G/C Fehlpaarung 4°C , für jede A/T Fehlpaarung 2°C , sowie für die direkt der Fehlpaarung benachbarten Basenpaare die entsprechenden Temperaturbeträge von der homologen Schmelztemperatur subtrahiert (Dingermann, persönliche Mitteilung).

Aus den Mutageneseansätzen B und D wurden je ca. 1000 Klone auf diese Weise getestet; es wurden tatsächlich Temperaturbedingungen gefunden, unter denen nur mehr einzelne Phagenklone ein Hybridisierungssignal zeigten, DNS-Sequenzierung führte jedoch in allen Fällen zu einem negativen Ergebnis. Der Grund für die offensichtlich äußerst geringe Ausbeute in den Mutageneseansätzen B und D mag möglicherweise an den drei Fehlpaarungen im Falle von Oligonukleotid "Cys" (TAT) liegen sowie an der Kürze und G/C-Armut der flankierenden Sequenzen von Oligonukleotid "Thr" (ACA) (Abb. 16).

Vorerst wurden keine weiteren Versuche zur Isolierung der Mutanten TAT (Cystein) und ACA (Threonin) unternommen. Dagegen sollten die aus den Ansätzen A und C erhaltenen Mutanten biochemisch charakterisiert werden. Voraussetzung

hierfür war die Rückklonierung des mutierten MluI/BstEII Fragmentes in das Serin-Acetyltransferase Strukturgen.

4. Rückklonierung des mutierten MluI/BstEII Fragmentes in pCys2 Δ MluI/BstEII

Für die Rückklonierung wurde RF-DNS aus den Klonen A-4, A-7, C-2 und C-9 isoliert und mit den Restriktionsenzymen MluI und BstEII geschnitten. Das Plasmid pCys2 wurde mit denselben Enzymen abgebaut. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden über "low melting" Agarosegele aufgetrennt. Das 7.4 kb große MluI/BstEII Restriktionsfragment aus pCys2 wurde isoliert und mit den ebenfalls aus dem Gel eluierten 0.6 kb MluI/BstEII Fragmenten aus den 4 Klonen in getrennten Ansätzen ligiert. Die rekombinierten Plasmide wurden in den Stamm E.coli JM39/24 transformiert. Selektion der Transformanten erfolgte auf cystein-freiem Minimalmedium in Gegenwart von Ampicillin. In allen Transformationsansätzen konnte eine große Anzahl cystein-prototropher, ampicillin-resistenter Klone isoliert werden, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß die Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure an Position 256 der Aminosäurekette nicht zum Ausfall der Serin-Acetyltransferase Aktivität führen. Ausgehend von der BstEII Restriktionschnittstelle wurde die Sequenz der rückklonierten Genanteile in den Klonen pA-4, pA-7, pC-2 und pC-9 bestimmt. Sie waren identisch mit der des Wildtypallels bis auf die gewünschten Austausche im Codon 256. Die Plasmide pA-4 und pA-7 enthielten das Codon AAA für Lysin, die Plasmide pC-2 und pC-9 das Codon GAA für Glutaminsäure.

Interessant war nun zu untersuchen, ob und in welcher Weise die durchgeführten Aminosäureaustausche einen Einfluß auf die Aktivität und Hemmbarkeit der Serin-Acetyltransferase haben.

5. Charakterisierung der Mutanten hinsichtlich Aktivität und Regulation der Serin-Acetyltransferase

Von den Stämmen JM39/24 (pA-4) und JM39/24 (pC-2) sowie den isogenen Vergleichsstämmen JM39/24 (pCys2) und JM39/24 (pWT2) wurden S30 Rohextrakte präpariert, und darin die Serin-Acetyltransferase Aktivität und ihre Sensitivität gegenüber dem Inhibitor L-Cystein bestimmt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Sie erlauben folgende Aussagen:

- (i) In Anwesenheit des Plasmides pCys2 ist die spezifische Aktivität der SAT um mehr als das Doppelte höher als die spezifische Aktivität in Anwesenheit des Plasmides pWT2. Dies ist auch der Fall, wenn die jeweiligen Strukturgene in nur 1 Kopie vorliegen (vergleiche Kapitel I.3.)
- (ii) Mit den Plasmiden pA-4 und pC-2 konnte eine dem Plasmid pCys2 vergleichbare spezifische Aktivität erzielt werden.
- (iii) Messungen der spezifischen Aktivität, nachdem die S30 Rohextrakte 48 Stunden bei 4°C aufbewahrt wurden, ergaben, daß die Kälteelabilität des Wildtypenzym in der Ausgangsmutante (Ile₂₅₆) bereits deutlich verringert ist. Lysin an dieser Position scheint die Kältestabilität des Enzyms weiter zu begünstigen.
- (iv) Im Hinblick auf die Sensitivität der SAT gegenüber dem Inhibitor L-Cystein sind die Aminosäuren Lysin und Glutaminsäure in ihrer Auswirkung mit Isoleucin vergleichbar, d.h. sie reduzieren die Hemmbarkeit der Mutantenenzyme verglichen mit dem Wildtypenzym um etwa den gleichen Faktor.

Tabelle 7: Bestimmung der Serin-Acetyltransferaseaktivität im S30-Extrakt verschiedener plasmidhaltiger Stämme

	Spezifische Aktivität (μ kat/mg) ^a		
	S30 frisch		S30 48 h bei 4°C
	ohne L-Cystein	10 μ M L-Cystein	ohne L-Cystein
JM39/24 (pWT2) (Met ₂₅₆)	3.2	0.7	1.5
JM39/24 (pCys2) (Ile ₂₅₆)	7.9	3.9	5.6
JM39/24 (pA-4) (Lys ₂₅₆)	8.8	4.7	8.6
JM39/24 (pC-2) (Glu ₂₅₆)	8.5	4.0	6.6

^a 1 kat: Umsatz von 1 Mol Substrat pro Sekunde

V. Anreicherung und Charakterisierung der Serin-Acetyltransferase aus E. coli

Die oben beschriebenen DNS-Sequenzen ergaben für das Strukturgen der Serin-Acetyltransferase, *cysE*, einen offenen Leserahmen von 819 Basenpaaren, der für ein Protein mit 273 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 29.2 kDa kodieren kann. Expression des *cysE* tragenden Plasmids pCys2 in Minizellen führte zur Synthese eines Proteins mit einem vergleichbaren Molekulargewicht von 34 kDa.

Über die Reinigung Serin-Acetyltransferase aus einem E.coli Wildtypstamm sollten nun die aus der DNS-Sequenz und dem Minizellexperiment abgeleiteten Ergebnisse mit der tatsächlichen Proteinstruktur korreliert werden.

1. Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus dem Stamm E.coli KL16/8 (pWT2)

Zur Anreicherung der SAT wurde E.coli KL16/8, der das Plasmid pWT2 enthielt, verwendet. Er zeigte im Vergleich zum plasmidfreien Stamm eine 40-fach erhöhte spezifische SAT Aktivität und war deshalb eine ausgezeichnete Quelle für die Anreicherung des Enzyms.

In Abbildung 18 ist die Reinigungsprozedur für die SAT schematisch dargestellt. Sie wurde in Anlehnung an die von Kredich et al. (1969) ausgearbeitete Methode zur Reinigung der Cysteinsynthase aus *Salmonella* (S.) *typhimurium* mit verschiedenen Modifikationen durchgeführt.

Ausgehend von 90g Zellen wurde ein ribosomenfreier Extrakt (S100) gewonnen. Durch Ammoniumsulfatfällung wurde die Serin-Acetyltransferase (SAT) Aktivität enthaltene Proteinfraction angereichert und anschließend an einer DEAE Trisacryl M Anionenaustauschersäule chromatographiert. Durch Anlegen

90 g Zellen von E.coli KL16 (pWT2)

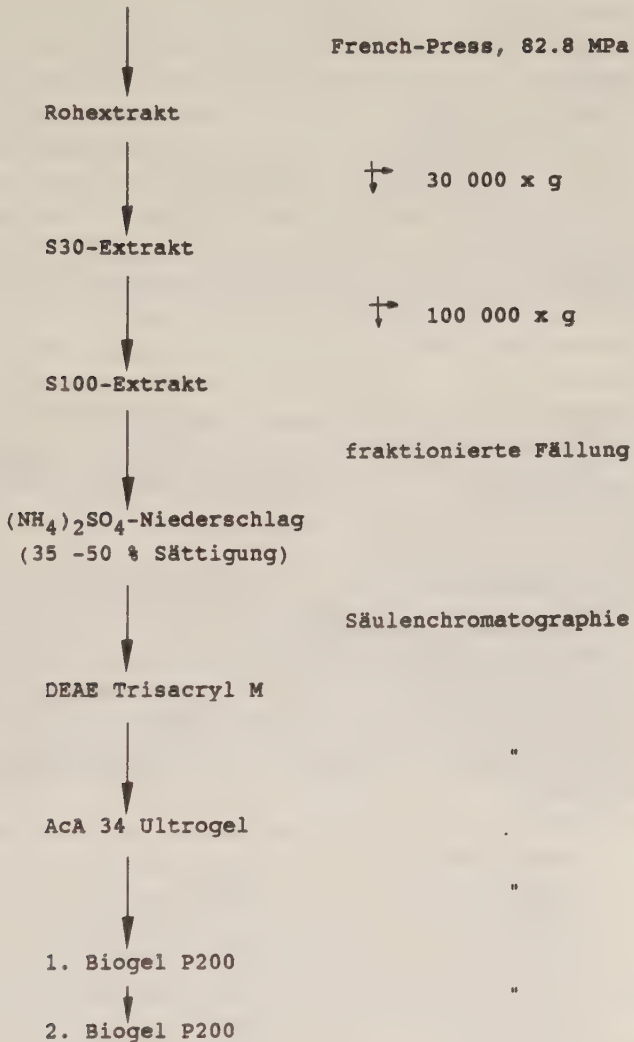


Abbildung 18:

Schema der Reinigungsprozedur der Serin-Acetyltransferase

eines linearen NaCl-Gradienten konnte die an das Säulenmaterial gebundene SAT Aktivität bei einer NaCl Konzentration von etwa 0,2 M wieder eluiert werden. Die SAT aktiven Fraktionen wurden vereint, und das aufkonzentrierte Protein über eine Ultrogel AcA 34 Gelsiebsäule aufgetrennt. Während dieser Reinigungsschritte fiel auf, daß zusammen mit der SAT Aktivität ein intensives gelbes Pigment angereichert wurde. Auch Kredich und Mitarbeiter (1969) beobachteten diese Phänomen bei der Reinigung der Serin-Acetyltransferase aus *S.typhimurium*. Sie konnten zeigen, daß die SAT in einem bifunktionalen Komplex mit der O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase (OAS-SH) (E.C.4.2.99.8.) assoziiert ist, die das gelb scheinende Coenzym Pyridoxalphosphat enthält (Becker et al. 1969). Den als Cysteinsynthase bezeichnete Enzymkomplex konnten sie durch O-Acetyl-L-Serin (OAS) in Konzentrationen von 0.1 bis 1 mM in die beiden Enzymaktivitäten dissoziieren (Kredich et al. 1969).

In analoger Weise führte die Chromatographie der SAT aktiven Fraktionen an Biogel P200 unter dissoziierenden Bedingungen (50 mM OAS) zu einem Abtrennen des gelben Pigmentes von der SAT Aktivität. Über SDS-Gel-Elektrophorese wurde die Auftrennung der Proteine aus den aktiven Säulenfraktionen der Ultrogel AcA 34 und Biogel P200 (50 mM OAS) Säule verfolgt. Sie zeigt

- (i) eine parallele Anreicherung zweier Proteinbanden mit apparenten Molekulargewichten von ca. 34 kDa und 36 kDa, möglicherweise den Untereinheiten der Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase (Abbildung 19a, Fraktionen 74 - 81), und
- (ii) eine Abtrennung der 36 kDa Bande von der 34 kDa Bande, verbunden mit einer weiteren Anreicherung dieses Proteins unter dissoziierenden Bedingungen, also in Anwesenheit von OAS (Abbildung 19b, Fraktionen 53-60).

Das Molekulargewicht von 36 kDa für die O-Acetyl-L-Serin Sulfhydrylase Untereinheit stimmt dabei mit dem von Boronat

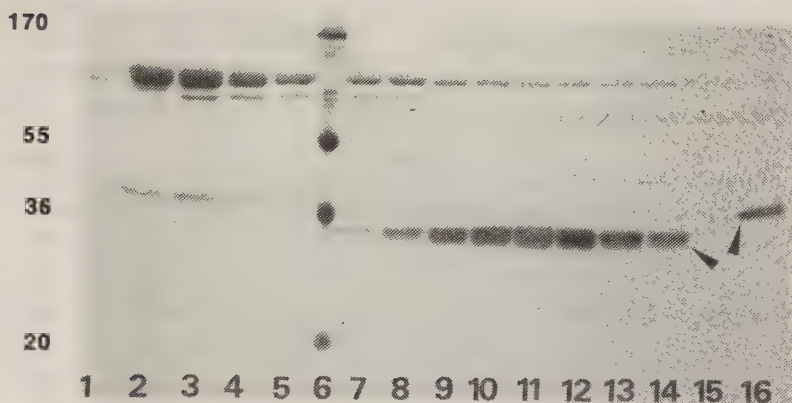
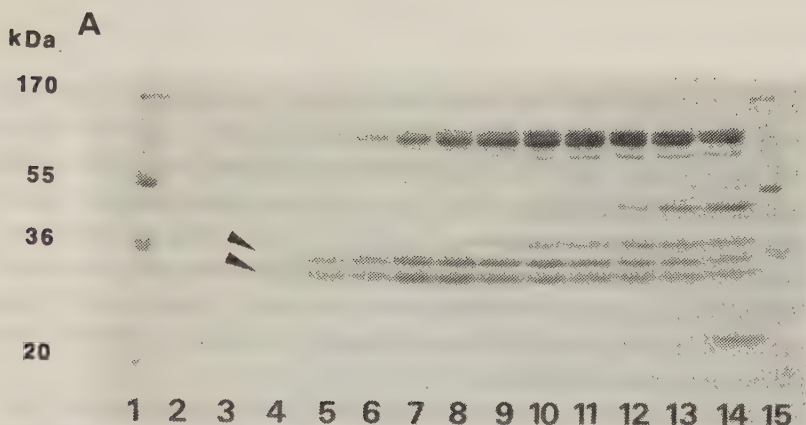


Abbildung 19:

Eindimensionale Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aus den Säulenfraktionen der a) AcA 34 Ultrogel Säule: (1), (15) Molekulargewichtsstandard; (2) Fraktion 45; (3) - (14) Fraktionen 72 - 83; und b) Biogel P200 Säule: (1) - (5) Fraktionen 45, 47, 49, 51, 52; (6) Molekulargewichtsstandard; (7) - (14) Fraktionen 53 - 60; (15), (16) Fraktion 66, 68. Die Pfeile kennzeichnen die parallele Anreicherung der Untereinheiten von SAT und OAS-SH (a) und ihre Trennung unter dissoziierenden Bedingungen (b).

et al. (1984) für das Enzym aus E.coli veröffentlichten Wert von ca. 34 kDa gut überein.

Um die in den aktiven Fraktionen der Biogel P200 (50 mM OAS) Säule noch vorhandenen Verunreinigungen abzutrennen (siehe Abbildung 19b), wurden sie vereint, durch Ultrafiltration aufkonzentriert und ein weiteres Mal über Biogel P200 chromatographiert. Wie Abbildung 20 zeigt, konnte auf diese Weise die Serin-Acetyltransferase in elektrophoretisch reiner Form dargestellt werden.

In Abbildung 21 ist der Gesamtverlauf der Anreicherung der Serin-Acetyltransferase in einem SDS-Polyacrylamidgel dargestellt. Aufgetrennt wurden die einzelnen SAT enthaltenen Proteinextrakte sowie die SAT aktivsten Fraktionen einer jeden Säule.

Die einzelnen Daten der Enzymreinigung sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.



Abbildung 20:

Eindimensionale Auftrennung der Proteine aus den Säulenfraktionen der 2. Biogel P200 Säule. (1) - (3) Fraktionen 42, 44, 46; (4) - (15) Fraktionen 48-59; (16) Molekulargewichtsstandard

Tabelle 8: Reinigung der Serin-Acetyltransferase aus
E.coli KL 16/8 (pWT2)

Fraktion	Protein (mg)	Einheiten (μ kat) ^a	spez. Aktivität (nkat/mg)	Ausbeute (%)	Anreiche- rungsfak- tor
S30-Extrakt	15750	25	1.5	100 %	
S100-Extrakt	10850	22	2.0	86 %	1.3
(NH ₄) ₂ SO ₄	747	14	19.3	57 %	13
Trisacryl M	138	10	77.0	42 %	51
AcA Ultrogel	28	4.9	169	19 %	113
Biogel P200 ^b	3.2	2.2	679	9 %	465

^a 1 kat: Umwandlung von 1 Mol Substrat pro Sekunde

^b Elution in Anwesenheit von 50 mM O-Acetyl-L-Serin

2. Versuche zur Bestimmung der stöchiometrischen Zusammen- setzung des Cysteinsynthase-Komplexes

Kredich und Mitarbeiter (1969) bestimmten über analytische Ultrazentrifugation für den Cysteinsynthase-Komplex von S.typhimurium ein Molekulargewicht von ca. 300 kDa, für die dissoziierten Enzyme Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin-Sulphydrylase Molekulargewichte von 160 kDa und 68 kDa. Ergebnisse aus Analysen der Aminosäurezusammensetzung des Komplexes und der voneinander getrennten Enzyme ergab, daß ein 1 Mol Synthasekomplex aus 1 Mol Serin-Acetyltransfe-
rase und 2 Mol O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase aufgebaut ist. Ferner konnte gezeigt werden, daß die OAS-SH aus zwei identi-
schen Untereinheiten besteht, wovon jede das Coenzym Pyridoxalphosphat gebunden hat. Die Untereinheitenstruktur der Serin-Acetyltransferase konnte nicht geklärt werden, da

es weder gelang die N-terminale Aminosäure zu bestimmen noch die Ergebnisse der Aminosäureanalysen mit der Bestimmung der tryptischen Peptidmuster in Einklang zu bringen. (Kredich et al., 1969; Becker et al., 1969).

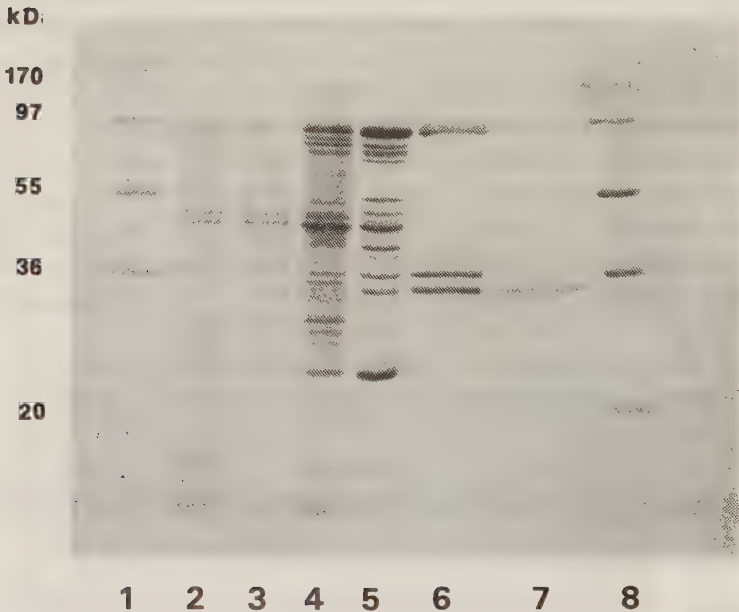


Abbildung 21:

Eindimensionale Auftrennung Serin-Acetyltransferase aktiver Proteinfractionen im SDS-Polyacrylamidgel. (1) und (8) Molekulargewichtsstandard; (2) S30-Extrakt; (3) S100-Extrakt; (4) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung (35 - 50% Sättigung); (5) DEAE Trisacryl M; (6) Aca 34 Ultrogel; (7) Biogel P200 (50 mM OAS).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß es sich bei der Serin-Acetyltransferase von E.coli um ein Enzym handelt, das aus einer einzigen Art von Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa (abgeleitet aus DNS-Sequenz) aufgebaut ist. Die Serin-Acetyltransferase ist mit dem Enzym O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase auch in E.coli in einem Komplex assoziiert, der in Gegenwart von O-Acetyl-L-Serin dissoziiert. Für die Untereinheit der OAS-SH wurde über SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese ein Molekulargewicht von ca. 36 kDa bestimmt. Ziel der im Folgenden dargestellten Untersuchungen war die Bestimmung der nativen Molekulargewichte der beiden Enzyme sowie des Enzymkomplexes. Dies sollte, zusammen mit den oben erwähnten Molekulargewichtsdaten der Enzymuntereinheiten, eine Analyse des stöchiometrischen Aufbaus des Enzymkomplexes aus den Komponenten bzw. den monomeren Untereinheiten erlauben.

Werden globuläre Proteine unter standardisierten Bedingungen an geeigneten Molekularsiebsäule chromatographiert, so kann für jedes Protein nach der Formel $K_{AV} = (V_E - V_0) \times V_X^{-1}$ der sogenannte durchschnittliche Verteilungskoeffizient ermittelt werden. Dabei gilt: V_E : Elutionsvolumen des Proteins; V_0 : Ausschlußvolumen der Säule und V_X : Volumen des Gelbettes. Durch Auftragen der K_{AV} -Werte von Proteinen bekannten Molekulargewichtes (Eichproteine) gegen den Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes kann eine Eichgerade erstellt werden, aus der über die K_{AV} -Werte von Proteinen mit unbekanntem Molekulargewicht dieses ermittelt werden kann. (Cooper, 1981).

Die Molekulargewichtsbestimmungen wurden durch Chromatographie eines S30-Extraktes, präpariert aus dem Stamm KL16/8 (pWT2), an einer Ultrogel AcA 34 Säule unter dissoziierenden (50 mM OAS) und nicht dissoziierenden Bedingungen durchgeführt. Als Eichproteine dienten die ebenfalls im S30 vorhandenen Aminoacyl-tRNS-Synthetasen für Phenylalanin (MG: 267 kDa), Threonin (MG: 160 kDa), Isoleucin (MG: 110 kDa) und Cystein (MG: ca. 50 kDa) (Hennecke, Dissertation 1977).

Aus den errechneten K_{AV} -Werten wurde die in Abbildung 22 gezeigte Eichgerade erstellt. Unter nicht dissoziierenden Bedingungen findet man OAS-SH vergesellschaftet in einem Komplex mit SAT aber auch, und das zu einem überwiegenden Anteil als Dimeres und Monomeres. Die Verteilung der Aktivitätsprofile unter dissoziierenden Bedingungen zeigt, daß 50 mM OAS zur totalen Abtrennung der OAS-SH von der SAT führt. Interessanterweise liegt unter dissoziierenden Bedingungen die OAS-SH aus *E.coli* fast ausschließlich als Monomeres vor. Dies wurde für das Enzym aus *S. typhimurium* nicht beobachtet (Kredich et al. 1969). Aus der in Abbildung 22 gezeigten Eichgeraden wurde für den Enzymkomplex ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa ermittelt. Für die von einander getrennten Enzyme SAT und OAS-SH wurden Molekulargewichte von ca 120 kDa und 80 bzw. 40 kDa respektive betimmt.

Zusätzlich zu den durchgeführten Molekulargewichtsbestimmungen wurde versucht, die Stöchiometrie der Untereinheiten beider Enzyme im Komplex durch Densitometrie eines mit Amidoschwarz gefärbten SDS-Polyacrylamidgels zu bestimmen. Dazu wurden die Proteine der Fraktion 76 der AcA 34 Ultrogel Säule (siehe Abbildung 19a) in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Amidoschwarz gefärbt. Dieser Farbstoff ermöglicht (im Gegensatz zu Coomassie Blue) eine stöchiometrische Anfärbung des Proteins unabhängig von der Ladung. In einem Gilford Spektralphotometer wurde die Farbtintensität der einzelnen Banden bestimmt. Abbildung 24 zeigt das Profil dieser Densitometrie. Peak 2 und 3 entsprechen den Untereinheiten von OAS-SH und SAT. Die Integrale der beiden Flächen stehen in einem Verhältnis von 1.02 : 1. Da beide Untereinheiten annähernd ähnliches Molekulargewicht besitzen sollten sie in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 am Aufbau des Cysteinsynthase-Komplexes beteiligt sein.

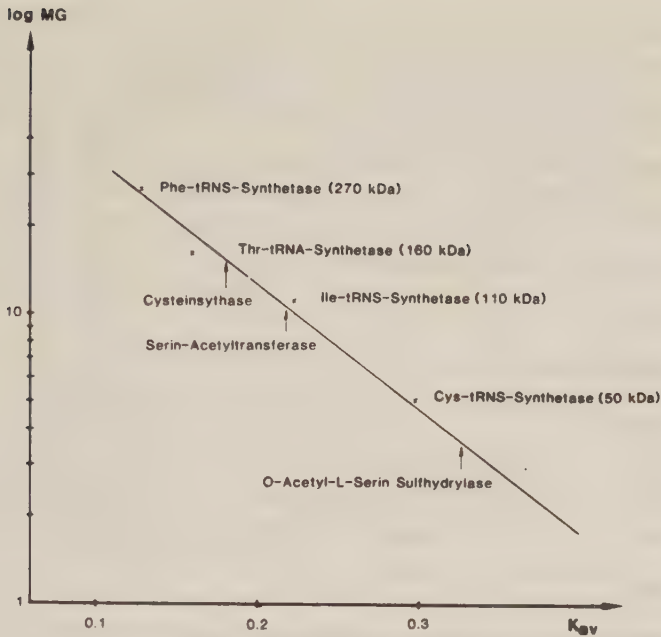


Abbildung 22:

Molekulargewichtsbestimmung der Serin-Acetyltransferase, O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase und Cysteinsynthase durch Gelfiltration an AcA 34 Ultrogel unter dissoziierenden und nicht dissoziierenden Bedingungen. Semilogarithmische Auftragung der relativen Verteilungskoeffizienten (K_{AV}) gegen das Molekulargewicht der Standardproteine und der Testproteine.

Bei einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa für den Komplex und Molekulargewichten von 34 kDa (SAT-Untereinheit) und 40 kDa (OAS-SH-Untereinheit) sowie der geforderten 1 : 1 Stöchiometrie wäre ein Aufbau des Komplexes aus 2 x 34 kDa (=SAT) + 2 x 40 kDa (=OAS-SH) = 148 kDa denkbar. Schwierigkeiten bereitet jedoch die Interpretation des unter dissoziierenden Bedingungen bestimmte Molekulargewicht für die SAT

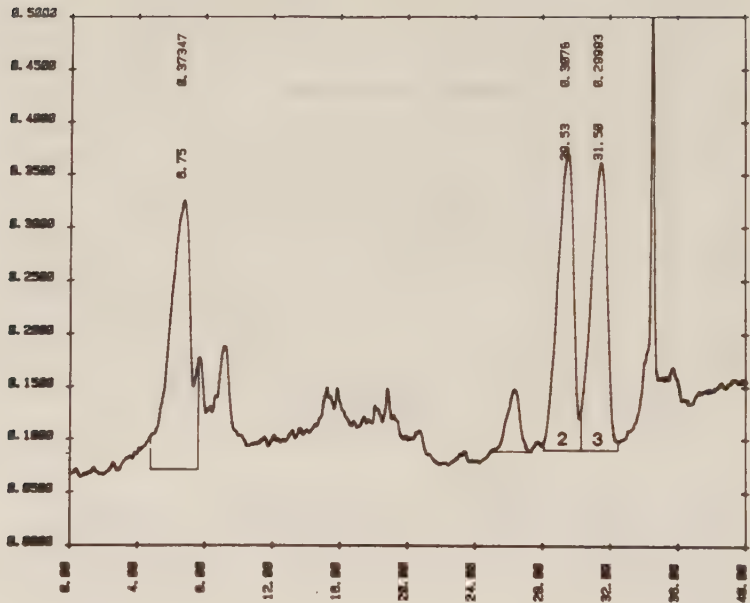


Abbildung 23:

Bestimmung des stöchiometrischen Verhältnisses der Untereinheiten von Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase im Cysteinsynthase-Komplex.

Densitometrische Auswertung der Anfärbung der Proteine aus Fraktion 76 der AcA 34 Ultrogel Säule (siehe Abb. 17a) mit Amidoschwarz nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel. Peak 2 und 3 repräsentieren die Untereinheiten von Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase.

von 120 kDa. Eine mögliche Erklärung, die jedoch experimentell nicht mehr getestet wurde, wäre eine Zusammenlagerung von vier SAT-Untereinheiten nach Abtrennung der OAS-SH. Die Inkonsistenzen der ermittelten Molekulargewichtsdaten mögen aber auch in Dissoziation/Assoziationsphänomenen während der Chromatographie oder in einer unregelmäßigen Tertiärstruktur begründet sein, die nicht derjenigen globulärer Proteine, wie sie für die angewandte Methode Voraussetzung ist, entspricht.

3. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Serin-Acetyltransferase Untereinheit aus E.coli

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der gereinigten Serin-Acetyltransferase aus E.coli sollte cysE DNS-Sequenz und SAT Proteinsequenz korrelieren. Trotz mehrfacher Durchführung der Sequenzreaktionen war es jedoch nicht möglich, eine eindeutige Identifizierung der Aminosäuren vorzunehmen. Es muß deshalb angenommen werden, daß der N-Terminus der Serin-Acetyltransferase Untereinheit blockiert und einer Sequenzierung nach der angewendeten Methode nicht zugänglich ist. Ein blockierter N-Terminus wurde auch für das Enzym aus *S.typhimurium* berichtet (Kredich et al. 1969).

VI. Konstruktion eines Cystein-Produzentenstammes und Optimierung der Cysteinproduktion

In Abschnitt I dieser Arbeit wurde über die Isolierung und Charakterisierung der Revertante JM240/33 des cystein-auxotrophen Stammes E.coli JM240 berichtet. JM240/33 weist eine Mutation des cysE-Gens auf, die zur Synthese einer "feedbackinsensitiven" Serin-Acetyltransferase führt. Dies wiederum verursacht die Überproduktion und Ausscheidung von Cystein ins Kulturmedium (vergleiche dazu auch Kapitel IV). Maximal wurden bei 48-stündiger Inkubation und zweimaliger Zugabe der Cysteinvorläufer Serin, Natriumacetat und Natriumsulfid 60 mg/l Cystein ausgeschieden.

Ausgehend von der Mutante JM240/33 wurde nun versucht, durch klassische Stammkonstruktion verbunden mit gentechnologischen Methoden einen Cystein-Produzentenstamm zu konstruieren.

1. Konstruktion des Produzentenstammes

Wie Abbildung 1 zeigt, ist die Biosynthese der Aminosäure Cystein eng mit derjenigen von Serin, Glycin und Methionin verknüpft. Für eine Akkumulation der Aminosäure Cystein sollten deshalb vornehmlich zwei Punkte von Bedeutung sein:

- (i) Ein Hinlenken des Kohlenstoffflusses zum Cystein durch Abkoppeln aller am Serin und Cystein ansetzenden Stoffwechselwege und
- (ii) eine Veränderung oder das Ausschalten der Regulationsmechanismen dieses Biosyntheseweges, um einen C - Flux hoher Rate in Richtung Cystein zu erzielen.

Durch die Mutation im cysE-Gen des Stammes JM240/33, die zur "Feedbackinsensitivität" der Serin-Acetyltransferase führte war Punkt (ii) zumindest teilweise erfüllt, so daß im Vordergrund der Stammkonstruktion folgende Ziele standen (siehe Abbildung 1):

1. Blockieren der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) Reaktion und damit ein Umlenken des Kohlenstoffflusses in den Cysteinast des verzweigten Biosyntheseweges.
2. Blockieren der Cystein-Desulphydrase Reaktion um den Abbau des im Überschuß produzierten Cysteins zu verhindern.
3. Blockieren der recA abhängigen Rekombinationsreparatur um die Stabilität klonierter Biosynthesegene während der Fermentation zu gewährleisten.
4. Transformation des Produzentenstammes mit dem Plasmid pCys2.

In Abbildung 24 ist die entsprechende Konstruktion des Cysteinüberproduzenten schematisch dargestellt.

1.1. Blockieren der Glycinbiosynthese

Zur stabilen Mutation des Strukturgens der Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) (glyA) wurde Phage MudI (amp^r, lac^r) verwendet. Der Mu-Phage inseriert zunächst in das zu mutagenisierende Gen (Lysogenisierung) und führt damit zum Ausfall der jeweiligen Enzymaktivität. Anschließend wird der Phage durch Hitzeinduktion wieder aus dem Gen eliminiert, was häufig mit der Deletion chromosomaler DNS Fragmente, die benachbart zur Exzisionstelle liegen, verbunden ist. Die so entstandenen Deletionsmutanten sind reversionsstabil und können über den Ausfall der Enzymaktivität identifiziert werden.

Nach Infektion des Stammes JM240/33 mit einem Mu-Phagen Lysat und anschließender Streptozotozinanreicherung (Lengeler, 1979) eventuell vorhandener glyA Mutanten wurden auf ampicillin- und glycinhaltigem Minimalmedium Mu-lysogene Mutanten isoliert. Von einigen 100 getesteten Mu-lysogene Mutanten erwies sich eine als glycin-auxotroph (JM240/331). Die Eliminierung des Phagen durch Hitzeinduktion führte zu 35 ampicillin-sensitiven Klonen. 16 willkürlich ausgewählte Mutanten zeigten nur in Anwesenheit von Glycin nicht aber mit Serin im

Minimalmedium Wachstum, so daß es sich bei ihnen um glyA Mutanten handeln muß. 8 dieser glycin-auxotrophen Klone wurden auf Cysteinproduktion in Flüssigkultur getestet. Der beste Produzent unter diesen Stämmen mit der Bezeichnung JM240/332

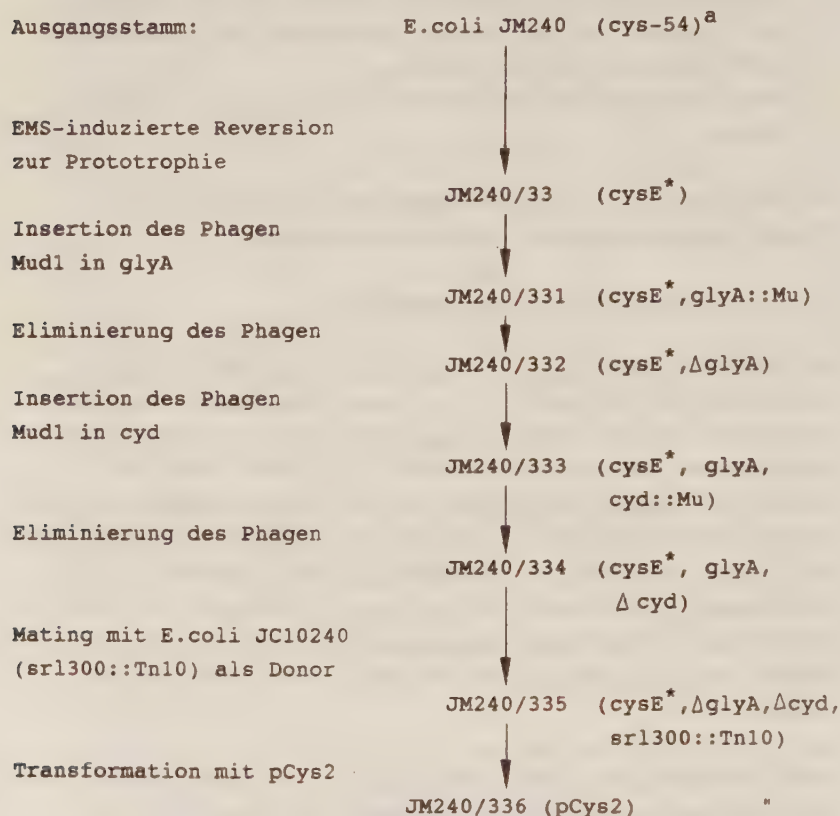


Abbildung 24:

Schema der Konstruktion eines Produzentenstammes für Cystein.

^a nur relevante Marker sind angegeben; glyA und cyd wurden nicht kartiert, nur phänotypisch bestimmt;

schied bei dreimaliger Zugabe von 0.1 ml eines Gemisches der Cysteinvorläufer Serin (10 mg/ml), Natriumacetat (100 mg/ml), Natriumsulfid (50 mg/ml) zu 10 ml Produktionskultur innerhalb von 72 h 140 mg/ml Cystein aus. Eine längere Produktionsdauer führte zu einer deutliche Abnahme der bereits produzierten Menge an Cystein (Abbildung 25). Dies ist vermutlich auf die Aktivität des Enzyms Cystein-Desulphydrase, das Cystein zu Brenztraubensäure, Ammoniak und Schwefelwasserstoff abbaut, zurückzuführen. In einer weiteren Mutageneserunde mit dem Phagen Mud1(amp,lac) sollte deshalb als nächstes versucht werden, den Cysteinabbau zu blockieren.

1.2. Blockieren des Cysteinabbaus

Nach Infektion des Stammes JM240/33 mit einem Mu-Phagenlysat wurden Mu-lysogene Mutanten auf ampicillin-haltigen Minimalmedium selektiert. Das "Screening" der ampicillin-resistenten Klone auf Ausfall der Cystein-Desulphydrase Aktivität erfolgte auf zwei verschiedenen Testplatten. Eine der beiden "Screeningmethoden" beruhte auf der gleichzeitigen Zugabe von 500 ug/ml Cystein und 0.1 % Bleicarbonat zum agar-haltigen Medium. Entsteht durch Cystein-Desulphydrase Aktivität aus Cystein Schwefelwasserstoff, so fällt dieser Bleisulfid aus und die entsprechende Kolonie färbt sich dunkelbraun. In einer Cystein-Desulphydrase defizienten Mutante (cyd) sollte die Färbung deutlich heller oder überhaupt nicht vorhanden sein. Diese Methode wurde erfolgreich beim "Screening" auf Mutanten mit besonders hoher Cystein-Desulphydrase Aktivität angewendet (Ohkishi et al., 1981). Die andere Art von Testplatten enthielten 1 mg/ml L-Cystein, eine Konzentration auf der nur E.coli Stämme wachsen sollten, die in der Lage sind, diese toxische Cystein-Konzentration durch Cystein-Desulphydrase Aktivität zu reduzieren (Collins et al. 1973).

Aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Mu-Infektions-Ansätzen des Stammes JM240/332 wurden über die beschriebenen Screening-Methoden 34 präsumptive Cystein-Desulphydrase nega-

tive, Mu-lysogene Mutanten ausgewählt. Durch Hitzeinduktion wurde versucht die Mu-Phagen zu eliminieren. Eliminierungsansätzen mit den einzelnen Mu-Mutanten erbrachten zwischen 1 und 14 ampicillin-sensitiven, temperatur-resistenten Mutanten. Das anschließende Screening auf Cystein-Desulphydrase Aktivität zeigte, daß jeweils nur mehr eine sehr geringe Anzahl der ampicillin-sensitiven, temperatur-resistenten Klone den Phänotyp der ursprünglichen Mu-Mutanten aufwiesen (kein Wachstum auf 1 mg/ml L-Cystein bzw. helle Farbe auf Bleicarbonat-Agar). Letztlich wurde bei 13 Mutanten eine quantitative Bestimmung von Cystein im Kulturüberstand durchgeführt. Unter ihnen fiel die Mutante mit der Bezeichnung JM240/334 auf, da sie über einen Zeitraum von 135 Stunden eine stetig ansteigende Tendenz zur Cysteinproduktion zeigte. Maximal wurden 195 mg/l erreicht (Abbildung 25).

Vergleichende Bestimmung der Cystein-Desulphydrase Aktivität ganzer Zellen von JM240/332 und JM240/334 zeigte eine deutlich reduzierte Aktivität für JM240/334. Die durchgeführte "Mu-Mutagenese" führte in ihm demnach nicht zu einem kompletten Ausfall sondern nur zu einer Verminderung der Cystein-Desulphydrase Aktivität.

1.3. Blockieren der Fähigkeit zur recA abhängigen Rekombinationsreparatur und Transformation mit dem Plasmid pCys2

Ziel war es das $cysE^+$ -Gen tragende Plasmid pCys2 in den Stamm JM240/334 einzubringen, um die Auswirkung der Anwesenheit des klonierten Strukturgens der "feedbackinsensitiven" Serin-Acetyltransferase auf die Cysteinproduktion zu untersuchen. Dazu war es zunächst notwendig, in diesem Stamm die Fähigkeit zu recA abhängige Rekombinationsreparatur zu beeinträchtigen, um die Stabilität des klonierten Gens während der langen Produktionsdauer zu gewährleisten.

In einem "Mating" Experiment mit dem Stamm JC10240 als Donor wurden recA Abkömmlinge von JM240/334 isoliert (vergleiche dazu auch Kapitel II.1.) Aus acht dieser recA Stämme wurde

die Mutante JM240/335 ausgewählt, da sie eine mit dem Elternstamm vergleichbare Cysteinproduktion aufwies.

Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pCys2 transformiert. Vier der erhaltenen pCys2 tragenden Transformanten wurden in ampicillin-haltigem Produktionsmedium auf Cysteinausscheidung

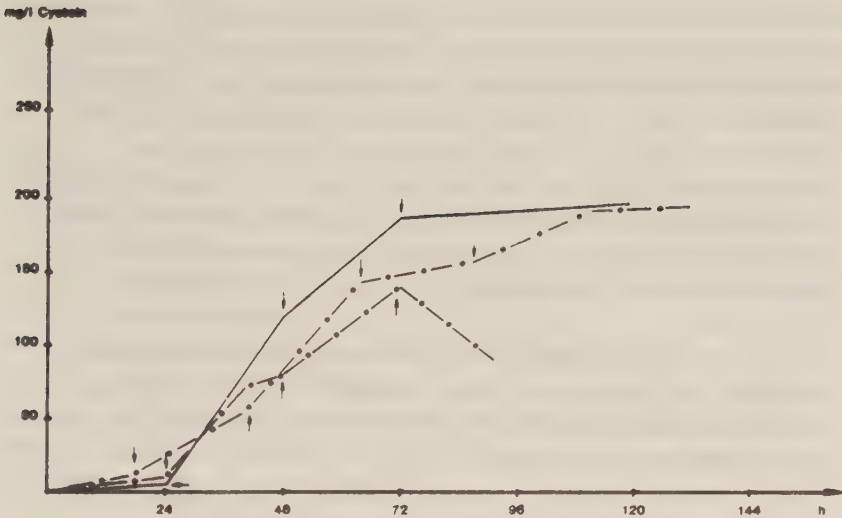


Abbildung 25:

Cysteinproduktion im Schüttelkolben unter Standardbedingungen mit den Stämmen —○— JM240/332, —●— JM240/334 und — JM240/336 (pCys2). ↓ Zugabe der Vorläufer in Standardkonzentrationen.

(Mittelwerte aus drei verschiedenen Produktionsversuchen)

getestet. Der Klon JM240/336 (pCys2) zeigte einen etwas rascheren Anstieg der ausgeschiedenen Cysteinmenge im Vergleich zum plasmidfreien Elternstamm; die absolut gebildete Cysteinmenge war jedoch nicht signifikant erhöht (Abb. 25).

Betrachtet man den in Abbildung 25 dargestellten Verlauf der Cysteinproduktion durch die verschiedenen Mutanten, so zeigt sich, daß durch Abkoppeln der Glycinbiosynthese, die mit der Mutante JM240/33 maximal erzielten Cysteinausbeute verdoppelt werden konnte. Das Blockieren des Cysteinabbaus hingegen hatte auf die maximal produzierte Menge keinen Einfluß, bewirkte jedoch eine deutliche Stabilisierung der Produktion über einen längeren Zeitraum. Die Transformation des Produzentenstammes mit dem *cysE**-Gen tragenden Plasmid pCys2 führte überraschenderweise zu keiner weiteren Steigerung der Cysteinproduktion. Dies zeigt, daß unter den angewandten Produktionsbedingungen die Menge der chromosomal kodierten "feedbackinsensitiven" Serin-Acetyltransferase für die Cysteinproduktion offensichtlich nicht limitierend ist.

In einer Reihe von Optimierungsversuchen mit den Stämmen JM240/334 und JM240/336 (pCys2) wurde versucht, die Cysteinproduktion sowohl in der 10 ml Schüttelkultur als auch im 1.5 l Fermenter zu steigern.

2. Versuche zur Optimierung der Cysteinproduktion

2.1. In der 10 ml Schüttelkultur

Unter der Standardkultur ist eine Kultur zu verstehen, deren Medium sich wie folgt zusammensetzt:

- 10 ml phosphatgepuffertes Minimalmedium (CM) mit
- 1 % Glucose
- 100 µg/ml Glycin
- 100 µg/ml Prolin
- 100 µg/ml Ampicillin (Anzucht von JM240/336 (pCys2))

Die Kulturen wurden mit dem jeweiligen Teststamm aus einer flüssigen Vorkultur angeimpft und in Wasserbadschüttlern (New Brunswick) bei einer Temperatur von 37°C und einer Schüttelstärke von 5 inkubiert. Nach Erreichen einer $OD_{420} = 3.5 - 4$ (entspricht stationärer Wachstumsphase) wurde 0.1 ml eines Gemisches aus den Cysteinovorläufern Serin (10 mg/ml), Natriumacetat (100 mg/ml) und Natriumsulfid (50 mg/ml) zugegeben. Im Abstand von ca. 24 Stunden wurde die Zugabe noch 1 bis 2 mal wiederholt.

Alle Testkulturen unterschieden sich von der Standardkultur nur in den jeweils aufgeführten Parametern. Die in den Tabellen angegebene Prozentwerte beziehen sich auf die in der Standardkultur zum angegebenen Zeitpunkt gemessenen Werte der optischen Dichte und Cysteinkonzentration.

Testreihe A: Stamm JM240/334

Folgende Parameter wurden in den 5 Testkulturen verändert:

- 1) Glucose 2 %
- 2) Glycin 200 µg/ml
- 3) Prolin 40 µg/ml
- 4) Aminosäuremix (40 µg/ml je Aminosäure)
- 5) Vitaminmix nach Wolin (1963)

Wie die in Tabelle 8 zusammengefaßten Werte dieser Testreihe zeigen, konnte in keiner der Testkulturen eine Steigerung der Cysteinausbeute erzielt werden.

Tabelle 8: Testreihe A: Stamm JM240/334

1	2	3	4	5
97 %	40 %	12 %	10 %	75 %

Die Prozentwerte beziehen sich auf 118 mg/ml (=100%) Cystein, die in der Standardkultur nach 72 Stunden und zweimaliger Zugabe der Vorläufer bestimmt wurden.

Testreihe B: Stamm JM240/334

Den fünf Kulturen dieser Testreihe wurden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase verschiedene nicht näher charakterisierte Detergentien, die von der Firma Schering AG zur Verfügung gestellt wurden, zugegeben. In Vorversuchen wurden die Konzentrationen eines jeden Detergenz bestimmt, welche die optisch Dichte der Kultur nur unwesentlich negativ beeinflussen.

Die Detergentien wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben:

- 1) Detergenz 1 0.01 %
- 2) Detergenz 2 0,01 %
- 3) Detergenz 4 0.1 %
- 4) Detergenz 5 0.5 %
- 5) Detergenz 6 0.05 %

Wie Tabelle 9 zeigt konnte durch Zugabe der Detergentien 1, 2, 4 und 6 die Cysteinausbeute leicht stimuliert werden, wogegen sich die Anwesenheit des Detergenz 5 negativ auf die Cysteinausscheidung auswirkte.

Tabelle 9: Testreihe B: Stamm JM240/334

1	2	3	4	5
117 %	105 %	110 %	45 %	126 %

Die Prozentwerte beziehen sich auf 200 mg/l Cystein (=100%), die in der Standardkultur nach 96 Stunden und dreimaliger Zugabe der Vorläufer bestimmt wurden.

Testreihe C: Stamm JM240/336 (pCys2)

In dieser Testreihe wurde die Zugabe der Cysteinvorläufer variiert. Die 10 Testkulturen unterschieden sich von der Standardkultur wie folgt:

- 1) Zugabe der Vorläufer zweimal pro Tag (etwa alle 10-14 Stunden) in Standardkonzentrationen
- 2-10) Zugabe der Vorläufer alle 24 Stunden jedoch mit variiertem Zusammensetzung (siehe Tabelle 10)

Die in Tabelle 10 zusammengefaßten Werte zeigen, daß eine zweimalige Zugabe der Cysteinvorläufer in Standardkonzentrationen pro Tag zu einer Verdopplung der Cysteinausbeute in dem plasmidhaltigen Stamm führt. Steigerung der Natriumsulfid-Konzentration bei gleichbleibenden Konzentrationen der übrigen Vorläufer führt bereits zu einer Steigerung um 42%. Variation der Serin- und Natriumacetat-Konzentrationen haben keinen bemerkenswerten Einfluß auf die Produktion.

Tabelle 10: Testreihe C: Stamm JM240/336 (pCys2)

Kulturen	Serin ($\mu\text{g/ml}$)	Na-Acetat (%)	Na-Sulfid (%)	% Ausbeute
1	100	0.1	0.05	200
2	150	"	"	95
3	200	"	"	91
4	250	"	"	95
5	100	0.15	"	100
6	"	0.2	"	117
7	"	0.25	"	115
8	"	0.1	0.075	121
9	"	"	0.1	144
10	"	"	0.125	140

Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Die

Prozentwerte beziehen sich auf 138 mg/l Cystein (=100%), die in der Standardkultur nach 72 Stunden und zweimaliger Zugabe der Vorläufer erzielt wurden.

Testreihe D: JM240/336 (pCys2)

In dieser Testreihe wurde vornehmlich der Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Cysteinproduktion bestimmt. In den Testkulturen 1-6 wurde Glucose durch folgende andere Kohlenstoffquellen ersetzt.

- 1) Glycerin 1 %
- 2) Glycerin 2 %
- 3) Bernsteinsäure 1 %
- 4) Glycerin 1 % und Ölsäure 0,5 mM
- 5) Glycerin 1 % und Ölsäure 5 mM
- 6) Ölsäure 5 mM
- 7) Inkubationstemperatur 30°C

In allen Fällen wurde eine drastisch Abnahme der Cysteinproduktion festgestellt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Testreihe D: Stamm 240/336 (pCys2)

1	2	3	4	5	6	7
23 %	22 %	23 %	8 %	6 %	16 %	42 %

Die Prozentwerte beziehen sich auf 177 mg/l Cystein (=100%), die in der Standardkultur nach 72 Stunden und zweimaliger Zugabe der Vorläufer erzielt wurden.

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche im Schüttelkolben zeigen, daß eine signifikante Steigerung der Cysteinausbeute mit dem plasmidhaltigen Stamm nur durch mehrmalige Zugabe der Cysteinvorläufer pro Tag erzielt werden konnte. In allen

anderen Fällen war entweder keine Veränderung oder sogar eine Abnahme der Cysteinerausbeute zu verzeichnen.

2.2 Optimierung im 1.5 l Fermenter

Die Optimierung der Cysteinproduktion im Kleinf fermenter wurde mit dem Stamm JM240/336 (pCys2) durchgeführt. Das Fermentationsvolumen betrug ca. 900 ml. Das verwendete CM-Minimalmedium enthielt 2 % Glucose sowie 100 µg/ml Glycin, Prolin und Ampicillin. Der Fermenter wurde mit 10 ml einer exponentiell wachsenden Vorkultur beimpft und mit einer Rate von ca. 1 VVM belüftet. Die Fermentationstemperatur betrug 37°C. Die Rührgeschwindigkeit war entweder 800 rpm (Lauf A) oder 600 rpm (Lauf B und C). Am Ende der spätlogarithmischen Wachstumsphase wurden die Cysteinvorläufer Serin (10 mg/ml), Natriumacetat (100 mg/ml) und Natriumsulfid (50 mg/ml) mit einer Zulaufgeschwindigkeit von entweder 3 ml/h (Lauf A und B) oder 4 ml/h (Lauf C) kontinuierlich zugepumpt.

Das Diagramm in Abbildung 26 zeigt den Vergleich der Cysteinproduktionskurven der Fermenterläufe A, B und C. Die wichtigsten Daten dieser Fermenterläufe sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

Tabelle 12: Fermentationsdaten von Lauf A, B, und C:
Stamm JM240/336 (pCys2)

	Rühr- geschwindigkeit	Zulauf der Vorläufer	max. OD ₄₂₀	Cystein- ausbeute
Lauf A	800 rpm	3 ml/h	2.6	582 mg/l
Lauf B	600 rpm	3 ml/h	2.9	744 mg/l
Lauf C	600 rpm	4 ml/h	3.4	935 mg/l

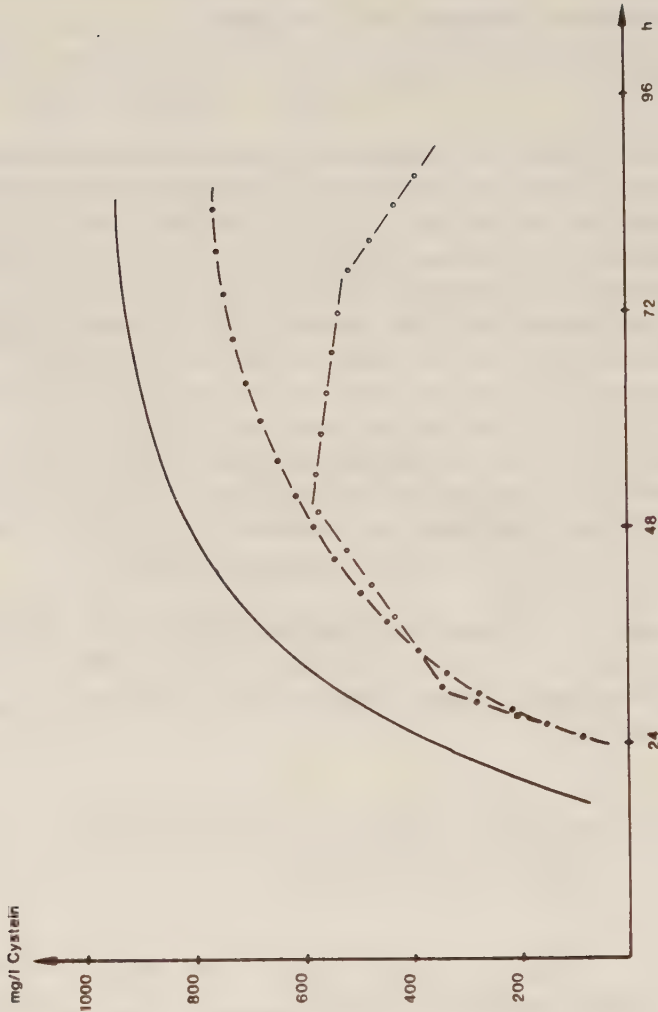


Abbildung 26:

Cysteinproduktion im Kleinfärmenter mit unterschiedlicher
Rührgeschwindigkeit und Zulauftrate: Stamm JM240/336 (pCys2)

- Lauf A: 800 rpm, 3 ml/h; —●— Lauf B: 600 rpm, 3 ml/h;
—— Lauf C: 600 rpm, 4 ml/h

Es zeigte sich, daß eine Rührgeschwindigkeit von 800 rpm sowohl die Zellausbeute als auch die Cysteinproduktion ungünstig beeinflußt. Dies ist vermutlich auf eine Schädigung der Zellen durch Scherkräfte zurückzuführen. Die Anhebung der Zulaufgeschwindigkeit der Cysteinvorläufer um 1 ml/h hat sich dagegen äußerst positiv ausgewirkt. Sie erbrachte eine Steigerung der Cysteinausbeute um fast 200 mg/l.

In Abbildung 27 ist der Zusammenhang von Cysteinproduktionskurve, Wachstumskurve, pH-Verlauf, Verbrauch von Glucose und Zugabe der Cysteinvorläufer des Fermenterlaufes C dargestellt. Die Produktionskurve zeigt, daß innerhalb der ersten 24 Stunden der Vorläuferzugabe die Cysteinproduktion nahezu linear mit einer Rate von etwa $24 \mu\text{Mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ verläuft. Dies entspricht bei einer Zulauftrate der Vorläufer von $38 \mu\text{Mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ einem 63%-igen Umsatz von Serin.

In diesem Zeitraum betrug der Glucoseverbrauch $166 \mu\text{Mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$, wogegen in der logarithmischen Wachstumsphase und in der späten Produktionsphase (ab 40 Stunden) die Rate nur bei $44 \mu\text{Mol} \times \text{l}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ lag. Der pH-Wert sank während der Wachstumsphase (innerhalb der ersten 36 Stunden) von pH 7.3 auf pH 6.2 ab und stieg dann wieder durch Zugabe von Natriumacetat und Natriumsulfid bis zum Ende der Produktionsphase auf Werte zwischen pH 8 und 9. Die Abnahme der optischen Dichte bis auf 1.7 am Ende der Produktionsphase ist neben dem Absterben der Zellen auch auf die Verdünnung der Fermenterbrühe durch die Zugabe der Vorläufer bedingt.

Alle bisher durchgeführten Optimierungsversuche im Schüttelkolben und im Fermenter deuten daraufhin, daß die Umwandlung der Aminosäure Serin in Cystein vornehmlich von der Verfügbarkeit der Vorläufer Serin, Natriumacetat und Natriumsulfid abhängt.

Die Steigerung der Cysteinausbeute im Fermenter bis auf knapp 1 g/l dürfte unter anderem auch auf die standardisierten Kulturbedingungen zurückzuführen sein.



Abbildung 27:

Fermentationsdiagramm von Lauf C (Rührgeschwindigkeit 600rpm, Zulauf der Vorläufer 4 ml/h): Stamm JM240/336 (pCys2).

— Cysteinproduktion; ---- Wachstumskurve;
—○— Glucoseverbrauch; —●— Vorläuferzugabe; —▼— pH-Verlauf

D. DISKUSSION

Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines E.coli Stammes für die Produktion der Aminosäure L-Cystein.

Generell erfordert die Überproduktion eines Metaboliten die "Ausweitung" seines Biosyntheseweges und damit die Aufhebung des ökonomischen Prinzips, das durch die Regulation auf der Ebene der Enzymaktivität und auf der Ebene der Enzymsynthese vorgegeben ist.

Eine solche "Ausweitung" kann durch folgende Eingriffe erreicht werden (Abb. 28):

1. Durch erhöhte Enzymsynthese bedingt durch (i) konstitutive Expression induzierbarer oder repressibler Gene (Abb. 28 Gene c, d, e und f) oder (ii) Steigerung der Kopienzahl v.a. von Genen, deren Produkte geschwindigkeitsbestimmende Schritte katalysieren.
2. Durch Umgehung der Endprodukthemmung über Desensitivierung regulatorischer Enzyme (Abb. 28 Enzyme c und e).
3. Durch "Kanalisation" des C-Flusses in Richtung des gewünschten Metaboliten durch Blockierung entsprechender Syntheseschritte (Abb. 28 $B \rightarrow C$, $F \rightarrow K$, $G \rightarrow I$, H).

Welche der genannten Faktoren für die Akkumulation eines bestimmten Metaboliten von besonderer Bedeutung sind, hängt entscheidend von der enzymatischen Ausstattung des jeweiligen Syntheseweges und von seiner spezifischen Regulation ab. Die genaue Kenntnis des entsprechenden Stoffwechselweges und der regulatorischen Knotenpunkte sind deshalb für die gezielte Konstruktion eines Produzentenstammes unabdingbare Voraussetzung.

Wie in der Einleitung ausgeführt, ist die Biosynthese der Aminosäure L-Cystein und deren Regulation in *E.coli* und *S.typhimurium* weitgehend aufgeklärt. Eine Betrachtung des in

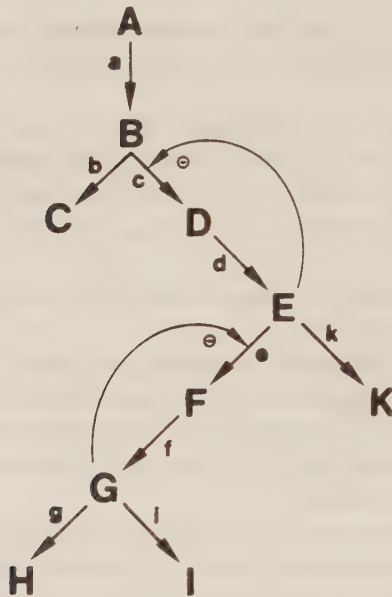


Abbildung 28:

Schema eines verzweigten Stoffwechselweges

Abbildung 1 dargestellten Biosyntheseschemas verdeutlicht die Schwierigkeiten, die sich der Entwicklung eines Cystein-überproduzenten entgegenstellen. Diese sind vornehmlich begründet in

- (i) der zentralen Rolle, die Cystein im Stoffwechsel als Schwefel-Donor für fast alle schwefelhaltigen Verbindungen spielt,
- (ii) der engen Verknüpfung seiner Biosynthese mit denjenigen anderer Aminosäuren und Oligopeptide, und

- (iii) der Regulation seiner Biosynthese, die sowohl auf Transkriptionsebene, vermittelt durch das *cysB* Genprodukt, sowie über Endprodukthemmung der Enzyme 3-Phosphoglycerinsäure-Dehydrogenase und Serin-Acetyltransferase stattfindet.

Arbeiten von Hulanicka und Kredich (1976) an *S.typhimurium* haben gezeigt, daß es sich bei der "Feedbackhemmung" der Serin-Acetyltransferase um eine äußerst effiziente Regulation handelt. Eine gesteigerte Synthese dieses Enzyms führte zu keiner erhöhten Produktion von O-Acetyl-L-Serin, dem direkten Vorläufer von Cystein und dem Induktor des Cysteinregulons (siehe Abbildung 1 und 2). Aus dieser Tatsache ergibt sich, daß die Desensitivierung des Schlüsselenzyms der Cysteinbiosynthese, Serin-Acetyltransferase, grundlegend für die Entwicklung eines Cysteinüberproduzenten ist.

I. Cystein-Auxotrophie des Stammes JM240

Die hohe durch Mutagen induzierte Reversionsrate des cystein-auxotrophen Stammes JM240, der als "mögliche" *cysE* Mutante bezeichnet war (B. Bachmann, persönliche Mitteilung), führte zur Isolierung der Revertante JM240/33, die nach Zugabe der Cysteinvorläufer Serin, Sulfid und Natriumacetat bis zu 60 mg/l Cystein im Medium akkumuliert. Die Cysteinausscheidung dieses Stammes konnte auf eine etwa 10-fache Reduktion der Sensitivität der Serin-Acetyltransferase gegenüber dem Inhibitor L-Cystein zurückgeführt werden.

Bestimmung der Serin-Acetyltransferase Aktivität des Stammes JM240 zeigte eindeutig, daß keine Läsion im *cysE* Gen vorliegt. Wachstumsversuche ergaben, daß die Auxotrophie dieses Stammes durch Supplementieren der Medien entweder mit Cystein, Serin, O-Acetyl-L-Serin, Sulfid oder Sulfit aufgehoben werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die Stimulierung des Wachstums durch die genannten Verbindungen ist die Annahme einer Mutation im *cysB*-Gens dieses Stammes. Sie

könnte ein ungenügende Expression der Gene *cysC* und *cysD* (Adenylylsulfat-Kinase und Sulfatadenylyl-Transferase), die relativ insensitiv gegenüber einer Derepression durch aktivierte *cysB* Genprodukt sind, verursachen (Kredich, 1983) (vgl. hierzu Einleitung und Abb. 2). Erhöhte O-Acetyl-L-Serin Produktion infolge Insensitivität der Serin-Acetyltransferase würde eine derartige Mutation suppremieren.

II. Genetische und biochemische Charakterisierung der Serin-Acetyltransferase aus E.coli

1. Das *cysE*-Gen

Die Sequenzanalyse des klonierten Strukturgens der Serin-Acetyltransferase ergab einen offenen Leserahmen von 819 bp, der für ein Protein von 273 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 29 kDa kodiert. Auffallend ist der relativ hohe Anteil an Alaninresten (fast 12 %) der abgeleiteten Aminosäuresequenz. Dies steht in Einklang mit Daten aus Gesamtaminosäureanalysen der Serin-Acetyltransferase aus *S.typhimurium*, die einen Alaningehalt von 12.8 % ergaben (Kredich et al., 1969).

Ein Vergleich der DNS-Sequenz des *cysE*-Gens mit der Nukleotidsequenz anderer Acetyltransferasen wie z.B. der Amino-glykosid-3-N-Acetyltransferase oder Chloramphenicol Acetyltransferase (Shaw, persönliche Mitteilung) ergaben keine nennenswerten Homologien.

Stromaufwärts des offenen Leserahmens des *cysE*-Gens konnten Signale für die Genexpression in *E.coli* gefunden werden. So befindet sich im Abstand von 6 bis 8 Basenpaaren vor dem als Initiationscodon angenommenen ATG eine mögliche Ribosomenbindestelle. Diese erfüllt zumindest teilweise die Primärstrukturvoraussetzung (AGG--6-9N--ATG), die, durch Vergleich von insgesamt 124 Genanfängen, für eine Ribosomenbindestelle gefordert wird (Stormo et al., 1982). Eine Verwendung dieses

ATG als tatsächliches Startcodon in vivo konnte nicht nachgewiesen werden, da, ähnlich wie in *S.typhimurium*, die N-terminale Aminosäure der Serin-Acetyltransferase blockiert ist (Kredich et al., 1969). Gegen eine Initiation der Translation an einem ATG weiter stromaufwärts spricht die Anwesenheit eines Stoppcodons in diesem Leseraster. Die Verwendung des nächsten ATG stromabwärts ist ebenfalls unwahrscheinlich, da keine Ribosomenbindestelle in entsprechendem Abstand vorhanden ist (Abb. 10).

Ein Vergleich der Nukleotidsequenz in dem Bereich 5' des Transkriptionsstartes bis zur Base -50 mit der Consensussequenz für *E.coli* Promotoren ergibt eine relativ gute Übereinstimmung (Hawley und McClure, 1983) (Abb. 29).

	-45	-36	-31		-13	-8	+1
Consensus	a	TTGACa	17 bp		TATaAT	7 bp	a
cysE-Gen	A	TTGCCG	17 bp		CAGCAT	7 bp	A
AT-Region		-35			-10		

Abbildung 29:

Vergleich der Promotorregion des cysE-Gens mit der Consensus-Sequenz von *E.coli* Promotoren. Kleine Buchstaben bedeuten mindestens 39 %, große mehr als 45 % Homologie in einem Vergleich von 112 Promotoren für *E.coli* Polymerase (Hawley und McClure, 1983)

Unüblich ist dagegen die relativ lange "Leader-Sequenz" zwischen Transkriptionsstart und Initiationscodon, in der ein sehr ausgeprägtes GC-reiches Palindrom auffällt. Aus der Sequenz ließe sich ein "Attenuations-Leaderpeptid" von 19 Aminosäuren ableiten, das zwar eine Anhäufung von Alanin- aber keine Cysteinreste enthalten würde. Bisher existieren jedoch keinerlei experimentelle Hinweise auf eine Regulation des cysE-Gens über Attenuation.

2. Die Serin-Acetyltransferase

Die Serin-Acetyltransferase aus *E.coli* wurde bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Das Enzym wanderte im SDS-Polyacrylamidgel als singuläre Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 34 kDa. Für den Aufbau der Serin-Acetyltransferase aus einer einzigen Art von Untereinheiten spricht auch (i) die Blockierung der N-terminalen Aminosäure und (ii) der etwa 40-fache Gen-Dosiseffekt der Serin-Acetyltransferase Aktivität in Transformanten, die das klonierte *cysE*-Gen tragen.

Die Ergebnisse der Enzymreinigung und der densitometrischen Auswertung des Cysteinsynthase-Komplexes lassen sich mit den aus nativen Molekulargewichtsbestimmungen erhaltenen Daten zu folgendem, rein hypothetischem Modell des Cysteinsynthase-Komplexes zusammenfassen (Abb.30):

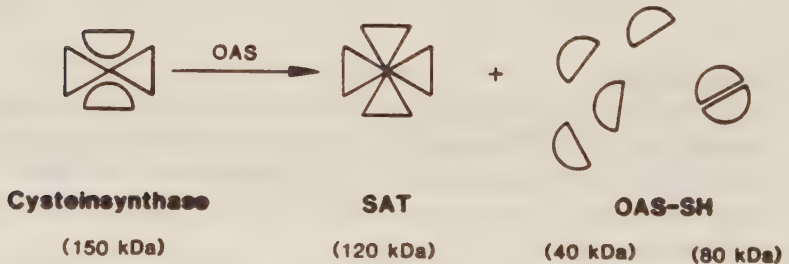


Abbildung 30:

Hypothetisches Modell des Cysteinsynthase-Komplexes von *E.coli*

Der Komplex ist aufgebaut aus je 2 Untereinheiten Serin-Acetyltransferase und O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase und hat somit eine $\alpha_2\beta_2$ Struktur. Unter dissoziierenden Bedingungen (50 mM O-Acetyl-L-Serin) zerfällt er in die verschiedenen Enzymaktivitäten, wobei es zu einer Zusammenlagerung von vier Untereinheiten der Serin-Acetyltransferase (α_4 -Struktur) kommt. Im Gegensatz dazu liegt die O-Acetyl-L-Serin-Sulphydrylase unter diesen Bedingungen fast vollständig in die Untereinheiten dissoziiert vor (β). Ein geringer Anteil scheint zu dimerisieren (β_2).

3. Identifizierung der zur "Feedbackinsensitivität" führenden Mutation in der Mutante JM240/33

Durch Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, daß die "Feedbackinsensitivität" der Serin-Acetyltransferase auf einem Austausch von Methionin gegen Isoleucin an Position 256 der Polypeptidkette beruht. Die Veränderung der "Feedbacksensitivität" durch einzelne Aminosäureaustausche in Enzymen ist bereits verschiedentlich in der Literatur beschrieben. So führt z.B. der Austausch von Glutaminsäure gegen Alanin in der Aminosäurekette der Phosphofruktokinase von E.coli dazu, daß Phosphoenolpyruvat, der allosterische Inhibitor des Enzyms, nun als Aktivator fungiert (Lau und Fersht, 1987).

Ausgehend von der Annahme, daß die Aminosäureposition 256 eine wesentliche Rolle am Aufbau des regulatorischen Zentrums der Serin-Acetyltransferase spielt, war zu erwarten, daß durch Permutation dieser Position Mutantenzymen mit interessanten regulatorischen Eigenschaften erzeugt werden könnten. Der gezielte Austausch von Methionin₂₅₆ gegen Lysin und Glutaminsäure durch Oligonukleotidmutagenese führte zu zwei Mutantenzymen, die sich in ihrem Regulationsdefekt jedoch nicht bzw. nur unwesentlich von dem Enzym unterschieden, das an dieser Position die Aminosäure Isoleucin besitzt. Auf Grund der Tatsache, daß die drei Aminosäuren Isoleucin, Glutaminsäure und Lysin, die sich in Struktur und

Ladung doch erheblich voneinander unterscheiden, in Bezug auf die Regulation der Serin-Acetyltransferase denselben Effekt haben, läßt sich folgendermaßen argumentieren. Die Inhibitorbindestelle der Serin-Acetyltransferase muß so konstruiert sein, daß nur im Falle von Methionin an Aminosäureposition 256 eine optimale Bindung des Inhibitors L-Cystein möglich ist. Jede Veränderung an dieser Position führt zu einer Verschlechterung der Inhibitorbindung. Interessant in diesem Zusammenhang wäre ein Austausch des Methionin₂₅₆ gegen Aminosäuren mit stark strukturgebenden Eigenschaften wie z.B. Prolin und Glycin sowie Veränderungen von Aminosäurepositionen in der Nachbarschaft von Methionin₂₅₆. Diese Ziele konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr verfolgt werden.

III. Konstruktion eines Cysteinüberproduzenten

Ausgehend von der Mutante JM240/33, die bereits 60 mg/l Cystein im Medium akkumulierte, wurde durch gezielte genetische Eingriffe ein Produzentenstamm entwickelt, der unter standardisierten Fermentationsbedingungen annähernd 1 g/l Cystein ausscheidet.

Ein essentieller Schritt auf dem Weg zur Konstruktion dieses Produzentenstammes war dabei die Abkopplung der Glycinbiosynthese. Sie führte zu einer Verdopplung der Cysteinausbeute. Vor diesem Eingriff wurde vermutlich der überwiegende Teil des extern zudosierten Serins durch die Serin-Hydroxymethyltransferase Reaktion, die immerhin 75 % des gesamten Bedarfs an C1 Körpern deckt, in Glycin umgewandelt. Ein weiteres Problem bestand auch in der Aktivität des Enzyms Cystein-Desulphydrase, das in Anwesenheit von Cysteinkonzentrationen von höher als 0.1 mM induziert wird und Cystein zu Pyruvat, H₂S und NH₃ abbaut. Diese Reaktion, die dem Schutz der Zelle vor toxischen Cysteinkonzentrationen dient (Collins et al., 1973), führte bei längerer Fermentationsdauer zu einer deutlichen Abnahme der Cysteinausbeute. Durch

Reduktion dieser Enzymaktivität infolge Mutation konnte die Cysteinproduktion über einen Zeitraum von 135 Stunden stabilisiert werden (Abb. 26).

Ein Wechsel des Produktionsmaßstabes von 10 ml im Schüttelkolben auf einen Kleinfermenter mit einem Arbeitsvolumen von ca. 900 ml bewirkte eine Verdopplung der Cysteinausbeute. Aus der kritischen Betrachtung eines Fermentationsdiagrammes (Abb. 28), das den Zusammenhang von Zellwachstum, Glucoseverbrauch, Vorläuferzugabe und Cysteinproduktion widerspiegelt, ergeben sich einige interessante Aspekte, die für eine weitere Optimierung der Produktion von Bedeutung sein dürften.

So fällt auf, daß sich die Cysteinproduktionskurve grob in zwei Abschnitte unterteilen läßt. Während der ersten Phase bis 24 Stunden nach Beginn der Vorläuferzugabe erfolgt die Produktion annähernd linear mit einer Umsatzrate von immerhin 63% (bezogen auf Serin). Bemerkenswert dabei ist der drastisch erhöhte Glucoseverbrauch während dieser Zeitspanne. Da zu Beginn der Vorläuferzugabe kaum mehr Zellwachstum stattfindet, ist anzunehmen, daß die Glukose vornehmlich zur Deckung des Energiebedarfs verwendet wird.

Das Ende der "produktiven" Phase nach etwa 40 Stunden Fermentationdauer ist charakterisiert durch einen signifikanten Rückgang der Produktionsrate, die schließlich nach etwa 72 Stunden stagniert, und durch eine deutlich Abnahme des Glucoseverbrauchs. Da zu diesem Zeitpunkt eine Limitierung der Produktion durch Glukose oder durch die Vorläufer unwahrscheinlich ist, muß eine Hemmung der Cysteinbiosynthese selbst oder des Energiestoffwechsels eintreten. Dies wäre denkbar durch:

- (i) Inhibition der Serin-Acetyltransferase durch die hohe Cysteinkonzentration in der Kulturbrühe. Wie mehrfach erwähnt, ist die Aufhebung der Endprodukt-hemmung der mutierten Serin-Acetyltransferase nicht vollständig.
- (ii) Vergiftung der Zellen durch hohe Sulfidkonzentration.

(iii) Anhäufung von Stoffwechselprodukten.

Die Hemmung der Serin-Acetyltransferase könnte möglicherweise umgangen werden, indem das produzierte Cystein entweder durch Oxidation oder Komplexierung aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Ersatz des Na_2S durch einen geeigneten Schwefeldonor könnte eine etwaige Vergiftung der Zellen verhindern.

Neben der Optimierung der Fermentationsbedingungen für eine Produktion von Cystein mit dem vorliegenden Stamm sind die unmittelbaren Ziele für eine weitere Stammentwicklung klar vorgezeichnet:

1. Desensitivierung der 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase und Klonierung des mutierten Strukturgens
2. Blockieren der Biosynthesen von Glutathion und Methionin
3. Blockieren des Serinabbaus
4. Aufhebung der durch das *cysB* Genprodukt vermittelten Endproduktrepression

Die Kombination der vorgeschlagenen genetischen Eingriffe mit optimierten Fermentationsbedingungen und einer einfachen und wirkungsvollen Eliminierung des Cysteins aus dem Fermentationsansatz lassen eine Cysteinüberproduktion mit einem gentechnologisch konstruierten *E.coli* Stamm über die bisher erzielte Menge von 1 g/l hinaus möglich erscheinen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Aminosäure L-Cystein existiert bisher kein wirtschaftlich interessantes fermentatives Produktionsverfahren. Die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit richtete sich deshalb darauf, die Möglichkeit der Entwicklung eines mit genetischen Methoden konstruierten E.coli Stammes für die Produktion von L-Cystein zu analysieren. Grundlage hierfür war die Charakterisierung des Schlüsselenzyms der Cysteinbiosynthese, der Serin-Acetyltransferase und seines Strukturgens *cysE*.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch Reversion eines cystein-auxotrophen E.coli Stammes konnte eine cystein-prototrophe Revertante mit "feedback-insensitiver" Serin-Acetyltransferase isoliert werden. Die Sensitivität des Enzyms gegenüber Endprodukthemmung durch L-Cystein ist im Vergleich zum Wildtyp etwa 10 fach reduziert. Als Folge davon scheidet die Revertante bis zu 60 mg/l Cystein aus.
2. Klonierung und Sequenzierung des Strukturgens der "feedbackinsensitiven" Serin-Acetyltransferase und Vergleich mit dem Wildtyp parallel erbrachte folgende Resultate:
 - Das Strukturgen der Serin-Acetyltransferase Untereinheit aus E.coli umfaßt eine codierende Region von 819 Basenpaaren. Dies entspricht einem Protein von 273 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 29 kDa.
 - Die zur "Feedbackinsensitivität" führende Mutation befindet sich an Position 767 des 819 bp langen Leserahmens. Die Transition von G zu A führt zu einem Amino-

- säureaustausch von Methionin₂₅₆ gegen Isoleucin₂₅₆.
- Gezielter Austausch des Methionins₂₅₆ gegen Lysin oder Glutamat durch Oligonukleotidmutagenese führte zu Mutantenzymen, deren Regulationsverhalten dem Enzym entspricht, das an Position 256 Isoleucin trägt. Lysin an dieser Position verringert die Kälteelabilität der Serin-Acetyltransferase.
 - Der Transkriptionsstart des *cysE*-Genes wurde 118 bp stromaufwärts des als ATG angenommenen Initiationscodons kartiert. Gute Homologien zu -10 und -35 Consensussequenzen sind vorhanden.
3. Anreicherung der Serin-Acetyltransferase aus *E. coli* zeigt, daß das Enzym aus einer Art von Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa aufgebaut ist. Die Serin-Acetyltransferase ist in einem bifunktionalen Enzymkomplex mit der O-Acetyl-L-Serin Sulphydrylase assoziiert. Die Untereinheiten beider Enzyme sind am Aufbau des Enzymkomplexes in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 beteiligt. 50 mM O-Acetyl-L-Serin führt zur vollständigen Dissoziation des Komplexes in die beiden Enzymaktivitäten. Der N-Terminus der Serin-Acetyltransferase Untereinheit ist blockiert.
4. Ausgehend von der Revertante mit "feedbackinsensitiver" Serin-Acetyltransferase wurde schrittweise ein Cystein-Produzent entwickelt. Konzentration des Kohlenstoffflusses in Richtung Cystein durch Blockieren der Glycinbiosynthese und des Cysteinabbaus sowie Einbringen des klonierten *cysE*^{*}-Gens führte zur Akkumulation von 400 mg/l Cystein. Diese in der 10 ml Schüttelkultur erzielte Cysteinausbeute konnte im 1.5 l Fermenter unter standardisierten Bedingungen auf annähernd 1 g/l gesteigert werden.

Weitere gezielte genetische Manipulationen dieses Produzentenstammes und geeignete Optimierungsmaßnahmen lassen eine Steigerung der Cysteinausbeute erwarten.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Aiba H, Adhya S, deCrombrughe B (1981) J Biol Chem 256:
11905-11910

Bachmann BJ (1983) Microbiol Rev 47: 180-230

Barrett EL, Chang GW (1979) J Gen Microbiol 115: 513-516

Becker MA, Kredich NM, Tomkins DM (1969) J Biol Chem 244:
2418-2439

Bedouelle H, Winter G (1986) Nature 320: 371-373

Berk AJ, Sharp PA (1977) Cell 12: 721-732

Berk AJ, Sharp PA (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75: 1274

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC (1977)
Gene 2: 95-113

Birnboim HC, Doly J (1979) Nucl Acids Res 7: 1513-1523

Boronat A, Britton P, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL, Lee LG,
Murfitt D, Parras F (1984) J Gen Microbiol 130: 673-685

Boyer HW, Roulland-Dussoix D (1969) J Mol Biol 41: 459-472

Casey J, Davidson N (1977) Nucl Acids Res 5: 1539

Casadaban MJ, Cohen SN (1979) Proc Natl Acad Sci USA
76: 4530-4533

- Chang JY, Brauer D, Wittmann-Libold B (1978) FEBS Letters
93: 205-214
- Christen AA, Pall ML, Manzara T, Lurquin PF (1983) Gene
23: 195-198
- Clewell DB, Helinski DR (1969) Proc Natl Acad Sci USA
62: 1159-1166
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1977) Proc Natl Acad Sci USA
69: 2110-2114
- Collins JM, Wallenstein A, Monty KJ (1973) Biochem Biophys
Acta 313: 156-162
- Cook PF, Wedding RT (1977) Arch Biochem Biophys 178: 293-302
- Cook PF, Wedding RT (1978) J Biol Chem 253: 7874-7879
- Cooper TC (1981) Biochemische Arbeitmethoden, de Gruyter,
Berlin, New York
- Dagert M, Ehrlich SD (1979) Gene 6: 23-28
- Dauce-Le Reverend B, Boitel M, DeSchamps AM, Lebeault J,
Sano K, Takinami K, Patte J (1982) Eur J Appl Mikrobiol
Biotechnol 15: 227-231
- Dougan G, Sherrat D (1977) Mol Gen Genet 151: 151-160
- Dreyfuss J, Monty KJ (1963) J Biol Chem 238: 1019-1024
- Dreyfuss J, (1964) J Biol Chem 239: 2292-2297
- Fimmel AL, Loughlin RE (1977) J Gen Microbiol 103: 37-43

- Furuya A, Araki K, Yoshida H (1979) Jpn Kokai Tokkyo Koho 7.980.490. (Cl.C12 D13/06) in Fermentations 91: 501
- Gaitonde MK (1967) Biochem J 104: 627-633
- Goldberg RB, Bender RA, Streicher SL (1974) J Bacteriol 118: 810-814
- Gray CP, Sommer R, Polke C, Beck E, Schaller H (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75: 50-53
- Hawley DK, McClure WR (1983) Nucl Acids Res 11/8:
- Hentschel C, Irminger JC, Buchner P, Birnstiel MC (1980) Nature 285: 147-151
- Hulanicka MD, Kredich NM, Treiman DM (1974) J Biol Chem 249: 867-872
- Hulanicka MD, Kredich NM (1976) Mol Gen Genet 148: 143-148
- Hulanicka MD, Hallquist SG, Kredich NM, Majica AT (1979) J Bacteriol 140: 141-146
- Jagura-Burdzy G, Hulanicka MD (1981) J Bacteriol 147: 744-751
- Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH (1984) Gene Anal Techn 1: 3-8
- Jones-Mortimer MC (1968a) Biochem J 110: 589-595
- Jones-Mortimer MC (1968b) Biochem J 110: 597-602
- Jones-Mortimer MC, Wheldrake JF, Pasternak CA (1968) Biochem J 107: 51-53
- Kosakowsky HM, Böck A (1970) Eur J Biochem 12: 67

- Kramer W, Drutsa V, Jansen HW, Kramer B, Pflugfelder M, Fritz HJ (1984) Nucl Acids Res 24: 9441-9456
- Krauss KF, (1984) Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
- Kredich NM, Tomkins GM (1966) J Biol Chem 241: 4955-4965
- Kredich NM, Becker MA, Tomkins GM (1969) J Biol Chem 244: 2428-2439
- Kredich NM (1971) J Biol Chem 246: 3474-3484
- Kredich NM, Hulanicka MD, Hallquist SG (1980) in Sulphur in Biology: Ciba Foundation Symposium 72: 87-99, Elsevier North Holland, New York
- Kredich NM (1983) In Herrmann KM, Sommerville RL Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation 115-132
- Kunkel TA, (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 488-492
- Laemmli UK (1979) Nature 227: 680-685
- Larson R, Messing J (1983) DNA 2: 31-35
- Lau FT, Fersht AR (1987) Nature 326: 811-812
- Lengeler J (1979) FEMS Microbiol Letters 5: 417-419
- Lindblow-Kull C, Kull F, Shrift A (1985) J Bacteriol 163: 1267-1269
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J Biol Chem 193: 265-275

- Maloy SR, Nunn WD (1981) J Bacteriol 145: 1100-1112
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning
Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour
- Maxam AM, Gilbert W (1980) In: Grossmann L, Moldave K (eds)
Methods in Enzymology 65: 499-466
- Messing J (1983) Methods in Enzymology 101: 20-78
- Messing J, Crea R, Seeburg PH (1981) Nucl Acids Res 9:
309-321
- Miller JH (1972) In Experiments in Molecular Genetics Cold
Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour
- Miyada G, Saberon X, Itakura K, Wilcox G (1982) Gene 17:
167-177
- Mizubuchi K, Demerec M, Gillespie DH (1962) Genetics 47:
1617-1627
- Mizukami T, Yagisawa M, Oka T, Furuya A, (1986) Agric Biol
Chem 50: 1019-1027
- Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF (1974) J Bacteriol 119:
736-747
- Ohkishi H, Nishikana D, Kumagai H, Yamada H (1981) Agric Biol
Chem 45: 253-257
- Pardee A (1966) J Biol Chem 241: 5886-5892
- Pasternak CA (1962) Biochem J 85: 44-49
- Peacock AC, Dingman CW (1969) Biochemistry 7: 668-674

- Robey EA, Wente SR, Markby DW, Flint A, Yang YR, Schachman HK
(1986) Proc Natl Acad Sci USA 83: 5934-5938
- Sagers RD, Gunsalus IC (1961) J Bacteriol 81: 541-549
- Saito H, Miura KJ (1963) Biochim Biophys Acta 72: 619-629
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) Proc Natl Acad Sci USA
74: 5463-5467
- Sano K, Matsuda K, Mitsugi K, Yamada F, Tamara F, Yasud N,
NodaI (1979) US Patent 4.006.057
- Schaffner M (1976) Cell 8: 471-478
- Schmidt A, Abrams WR, Schiff JA (1974) Europ J Biochem
47: 423-434
- Shine J, Dalgarno L (1974) Proc Natl Acad Sci USA 71:
1342-1346
- Siegel LM (1965) Anal Biochem 11: 126-132
- Southern EM (1975) J Mol Biol 98: 503-517
- Spencer HT, Collins J, Monty KJ (1967) Fed Proc 26: 677
- Stalker DM, Hiatt WR, Comai L (1985) J Biol Chem 260:
4724-4728
- Stormo GD, Schneider TD, Gold LM (1982) Nucl Acids Res
10: 2971-2995
- Thomas PG, Russell AJ, Fersht AR (1985) Nature 318: 375-376
- Tsang MLS, Schiff JA (1978) Plant Sci Lett 11: 177-183

- Ullrich A, Shine J, Chirwin J, Pictet R, Tischler E, Rutter WJ
Goodman HM (1977) Science 196: 1313-1319
- Walker JE, Gay NJ (in press) in Methods of Enzymology
- Weaver RF, Weissmann C (1979) Nucl Acids Res 7: 1175-1193
- Wich G, Hummel H, Jarsch M, Bär U, Böck A (1986) Nucl Acids
Res 14: 2459-2479
- Wilkinson AJ, Fersht AR, Blow DM, Carte PC, Winter G (1984)
Nature 307: 187-188
- Wolin EA et al. (1963) J Biol Chem 238: 2882
- Yadav N, McDevitt RE, Benard S, Falco SC (1986) Proc Natl
Acad Sci USA 83: 4418-4422
- Yanish-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Gene 33: 103-119
- Yamada H, Kumagi H, Ohkishi H (1976) US Patent 3.974.031
- Zoller MJ, Smith M (1982) Nucl Acids Res 10: 6487-6500

Herrn Prof. Dr. A. Böck möchte ich sehr herzlich für seine Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken. Seine Diskussionsbereitschaft sowie seine zahlreichen Tips und Anregungen waren mir immer eine große Hilfe.

Frau Anita Friesenegger, Frau Claudia Hollunder und Frau Gabi Schilling danke ich für die sorgfältige Assistenz bei zahlreichen Versuchen.

Der Firma Schering AG danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.

Allen Mitarbeitern am Lehrstuhl für Mikrobiologie möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die jederzeit gewährten Hilfestellungen danken.

Im besonderen gilt mein Dank meinen Laborkollegen Dorothea, Scarlett, Günter und Konrad, deren persönliche Freundschaft sowie wissenschaftliche Kritik und Motivation für mich von großer Bedeutung waren.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem Mann für seine kritische Auseinandersetzung mit der vorliegenden Arbeit und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Dagmar Schmid, geb. Denk
Geburtstag, Geburtsort:	5.6.1953 in München
Eltern:	Josefa und Eduard Denk
Familienstand:	seit 19.12.1986 verheiratet mit Dr. Gerhard Schmid

Ausbildung

1959 - 1965	Volksschule, München
1965 - 1969	Ricarda-Huch-Realschule, München
1969 - 1971	Ausbildung zur Vet.Med.Techn. Assistentin, München
1971 - 1973	Anstellung als VMTA am Tropen- institut, München
1973 - 1976	München-Kolleg, Institut zur Erlangung der Hochschulreife
1976 - 1977	Anstellung als VMTA am Tropen- institut, München
1977 - 1984	Studium der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians- Universität, München
1984 - 1987	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck

